

ROGÉRIO APARECIDO DEPIERI

DANOS EM SEMENTES DE SOJA *Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae), MORFOLOGIA
DOS ESTILETES E ENZIMAS SALIVARES DE PENTATOMÍDEOS FITÓFAGOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Antônio Ricardo Panizzi

Curitiba – PR

2010

DANOS EM SEMENTES DE SOJA *Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae), MORFOLOGIA
DOS ESTILETES E ENZIMAS SALIVARES DE PENTATOMÍDEOS FITÓFAGOS

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de "Doutor em Ciências Biológicas" no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Dr. Antônio Ricardo Panizzi (Orientador)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Soja
(Embrapa Soja) Londrina, PR

Dr. Edson Hirose
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Soja
(Embrapa Soja) Londrina, PR

Dr. José de Barros França-Neto
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Soja
(Embrapa Soja) Londrina, PR

Profa. Dra. Lúcia Massutti de Almeida
Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

Profa. Dra. Sonia Maria Noemberg Lazzari
Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

Profa. Dra. Cibele Stramare Ribeiro-Costa - (Suplente)
Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

Curitiba, 22 de fevereiro de 2010.

*"...natura nusquam magis est quam in
minimis tota sit..."*

"...em parte alguma encontramos a
natureza na sua totalidade como nas suas
menores criaturas..."

Naturalis Historiae, Liber XI

Gaius Plinius Secundus

(23-79 d.c.)

É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar,
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver...

Martin Luther King

Aos meus pais e melhores amigos,

OFEREÇO

À minha esposa Rosemeire,
por todo companheirismo e
confiança em nossa luta.

Ao Pedro Rogério
querido filho, meu projeto de vida

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Dr. Antônio Ricardo Panizzi, pelo apoio e orientação permanentes, incentivo, ensinamentos e amizade.

Ao programa de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal do Paraná, a todo seu corpo docente, em especial às Professoras Dras. Lúcia Massutti de Almeida e Sonia Noemberg Lazzari, pelo incentivo e sugestões valiosas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Soja, especialmente a Equipe de Entomologia pela amizade e colaboração.

Aos técnicos do Laboratório de Solos, pelo apoio nas análises de resistência.

Aos técnicos do Laboratório de Tecnologia de Sementes, pelo auxílio na utilização da estufa.

Aos funcionários do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina, em especial à Professora Dra. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade e seu orientado, Juca San Martin, e ao técnico Osvaldo Capello.

Ao Professor Dr. Walter Ribeiro Terra e Equipe do Laboratório de Bioquímica de Insetos (IQ-USP) pelo apoio nas análises enzimáticas.

Aos amigos Fabiane Cunha, Fábio Siqueira, Flávia A. Cloquet Silva, Jovenil J. Silva, Simone S. Prado e Talita M. Alexandre pelos bons e maus momentos que passamos juntos.

Agradecimentos especiais às Dras. Ana Maria Meneguim e Sueli de Souza Martinez, minhas primeiras mentoras na Entomologia.

ÍNDICE

EPÍGRAFE	iii
DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE FIGURAS	xviii

CAPÍTULO 1

Introdução geral

1.1. Introdução	1
1.2. Pentatomídeos fitófagos e os danos em soja	2
1.3. Aparelho bucal dos insetos sugadores	5
1.4. Objetivos	7
1.4.1. Objetivo geral	7
1.4.2. Objetivos específicos	8
1.5. Literatura citada	8

CAPÍTULO 2

Duração dos períodos de pré-alimentação e alimentação, e área e profundidade de danos em sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merr.] (Fabaceae) causados por pentatomídeos fitófagos

2.1. Introdução	16
-----------------------	----

2.2. Material e métodos	17
2.2.1. Períodos de pré-alimentação e de alimentação, e área de dano superficial em sementes de soja	18
2.2.2. Profundidade do dano em sementes de soja em tempo de alimentação fixo	20
2.2.3. Danos histológicos em sementes de soja	21
2.2.4. Delineamento experimental e análise estatística	23
2.3. Resultados e discussão	23
2.3.1. Períodos de pré-alimentação e alimentação e dano superficial nas sementes de soja	23
2.3.2. Profundidade do dano em sementes de soja em tempo fixo	26
2.3.3. Danos histológicos em sementes	27
2.4. Literatura citada	32

CAPÍTULO 3

Nova metodologia para o processamento do aparelho bucal de hemípteros (Heteroptera) para estudos microscópicos

3.1. Introdução	37
3.2. Material e métodos	38
3.3. Resultados e discussão	40
3.4. Literatura citada	42

CAPÍTULO 4

Comprimento do rostro, morfologia comparada da dentição mandibular e área dos canais de alimento e de saliva de percevejos pentatomídeos fitófagos (Heteroptera)

4.1. Introdução	44
-----------------------	----

4.2. Material e métodos	45
4.2.1. Criação dos percevejos em laboratório	45
4.2.2. Preparação das amostras para análises do rostro e da ponta das mandíbulas ...	46
4.2.3. Área da secção transversal do canal de alimento e do canal de saliva, e junções dos estiletes maxilares	47
4.2.4. Delineamento experimental e análise estatística	49
4.3. Resultados e discussão	50
4.3.1. Comprimento do rostro e morfologia da ponta da mandíbula	50
4.3.2. Área da secção transversal do canal de alimento e do canal de saliva, e junções dos estiletes maxilares.....	52
4.4. Literatura citada	56

CAPÍTULO 5

Efeitos do envelhecimento e do tipo de alimento no desgaste da dentição mandibular do pentatomídeo fitófago *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera)

5.1. Introdução	59
5.2. Material e métodos	60
5.2.1. Criação dos percevejos em laboratório	60
5.2.2. Preparação das amostras e medições realizadas	61
5.2.3. Resistência do alimento à penetração	62
5.2.4. Delineamento experimental e análise estatística	63
5.3. Resultados e discussão	63
5.3.1. Desgaste mandibular em adultos de <i>Euschistus heros</i>	63
5.3.2. Resistência do alimento à penetração	66
5.4. Literatura citada	69

CAPÍTULO 6

Análise preliminar de α -amilase, protease e endocelulase em saliva de percevejos pentatomídeos (Heteroptera)

6.1. Introdução	72
6.2. Material e métodos	74
6.2.1. Coleta de saliva	75
6.2.2. Ensaio para α -amilase	75
6.2.3. Ensaio de protease (cisteína-proteases – Catepsina L)	76
6.2.4. Ensaio para carboximetil-celulase	76
6.3. Resultados e discussão	77
6.4. Literatura citada	85

CONSIDERAÇÕES FINAIS

ANEXOS

Anexo 1.1. Duração dos tempos de pré-alimentação e alimentação, e área do dano superficial em sementes de soja madura por quatro espécies de pentatomídeos	93
Danos x tempo de alimentação de <i>Dichelops melacanthus</i>	93
Danos x tempo de alimentação de <i>Euschistus heros</i>	94
Danos x tempo de alimentação de <i>Nezara viridula</i>	95
Danos x tempo de alimentação de <i>Piezodorus guildinii</i>	96

Anexo 1.2. Profundidade do dano em sementes de soja causado pela alimentação de quatro espécies de pentatomídeos após sessão de alimentação de 60 min	97
--	----

Profundidade do dano (mm) em sementes de soja por <i>Dichelops melacanthus</i>	97
Profundidade do dano (mm) em sementes de soja por <i>Euschistus heros</i>	98
Profundidade do dano (mm) em sementes de soja por <i>Nezara viridula</i>	99
Profundidade do dano (mm) em sementes de soja por <i>Piezodorus guildinii</i>	100
 Anexo 2.1. Dimensões do aparelho bucal de pentatomídeos fitófagos adultos	101
Comprimento e largura da ponta da mandíbula da mandíbula de pentatomídeos	101
Comprimento do rostro de pentatomídeos fitófagos	101
Área da secção transversal dos canais de alimento e de saliva e relação Ca/Cs em pentatomídeos	102
 Anexo 3.1. Desgaste da dentição mandibular de <i>Euschistus heros</i> em diferentes idades e dietas	103
 Anexo 3.2. Resistência da dieta natural e da dieta artificial à penetração	104

RESUMO

Visando esclarecer a etiologia dos danos em soja *Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae) causados por pentatomídeos fitófagos, foram avaliados os danos em sementes, a morfologia dos estiletes e enzimas salivares. Primeiramente, avaliou-se a área, a profundidade, e a histologia dos danos em sementes de soja causados pelos percevejos *Dichelops melacanthus* (Dallas), *Euschistus heros* (F.), *Nezara viridula* (L.), *Piezodorus guildinii* (West.), e a relação entre o tempo de alimentação das espécies citadas acima com a área de dano. O tempo de alimentação foi significativamente maior para *N. viridula* (ca. 133 min) comparado com *E. heros* e *D. melacanthus* (ca. 70 min); *N. viridula* e *P. guildinii* tiveram tempos de alimentação similares. A área do dano superficial nas sementes decresceu de 4.0 mm² para *P. guildinii* a 0,3 mm² para *D. melacanthus*. Observou-se correlação positiva entre tempo de alimentação e a área de dano resultante para *E. heros*, *N. viridula* e *P. guildinii* ($R^2 > 0,80$, $P < 0,0001$). Entretanto, para *D. melacanthus* essa correlação não foi significativa ($R^2 = 0,1011$, $P = 0,1493$). *P. guildinii* causou em dano alimentar mais profundo nas sementes, enquanto a de *D. melacanthus* resultou em danos menos profundos em comparação às outras espécies. A alimentação de *E. heros* e *N. viridula* resultou em valores intermediários de profundidade do dano. O dano histológico causado pela perfuração das sementes pelos estiletes foi caracterizado pela destruição das células e pela fusão e dissolução dos corpos de proteína, possivelmente provocados por enzimas digestivas. Nas sementes atacadas por *P. guildinii*, os corpos de proteína foram completamente destruídos, sugerindo maior ação deletéria das enzimas salivares para os tecidos da semente para esse percevejo em comparação às outras espécies estudadas. *N. viridula* apresentou o maior comprimento do rostro (5,9 mm) e *P. guildinii* o menor (3,5 mm); para *D. melacanthus* e *E. heros* esse valor foi intermediário e similar. O comprimento e largura da ponta das mandíbulas foram maiores em *N. viridula* e

menores em *P. guildinii*. *E. heros* apresentou comprimento da ponta da mandíbula maior que *D. melacanthus*, mas a largura da ponta das mandíbulas foi similar. Todas as espécies mostraram um padrão similar de dentição na ponta das mandíbulas. Para estudos visando detalhar as áreas dos canais de alimento e de saliva, sugere-se o corte dos estiletes na altura do terceiro segmento do rostro tratado com EDTA em banho de gelo e exposto por 0,5 h em micro-ondas. As áreas da secção transversal do canal alimentar e do canal salivar no terceiro segmento do rostro foram maiores em *N. viridula* e *D. melacanthus* em comparação com *E. heros* e *P. guildinii*. Essa última espécie apresentou os canais menos calibrosos. Entretanto, quando se considera a relação entre os canais, *P. guildinii* apresentou valor relativo mais alto, possuindo área do canal de alimento relativamente maior do que as outras espécies estudadas. Cisteína-proteases estavam presentes na saliva de *D. melacanthus* e *N. viridula* e ausentes em *E. heros*. Em *D. melacanthus*, *E. heros* e *N. viridula* não se observou atividade de α -amilase salivar. Carboximetil-celulases não foram observadas na saliva dessas três espécies.

ABSTRACT

Aiming to clarify the etiology of the damage in soybean *Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae) caused by phytophagous pentatomids in seeds, the morphology of stylets and digestives salivary enzymes were evaluated. Initially, the surface, depth and histology of damages to soybean seeds caused by *Dichelops melacanthus* (Dallas), *Euschistus heros* (F.), *Nezara viridula* (L.), and *Piezodorus guildinii* (West.) were evaluated, and the relationship between feeding time and seed damage were estimated. Feeding time was significantly longer for *N. viridula* (ca. 133 min.) compared to *E. heros* and *D. melacanthus* (ca. 70 min.); *N. viridula* and *P. guildinii* had a similar feeding time. The area resulted in superficial damage to the seeds varied from 4.0 mm² caused by *P. guildinii* down to 0.3 mm² caused by *D. melacanthus*. There was a positive correlation between feeding time and resulting damage for *E. heros*, *N. viridula* and *P. guildinii* ($R^2 > 0.80$, $P \leq 0.0001$). However, for *D. melacanthus* this correlation was not significant ($R^2 = 0.1011$, $P = 0.1493$). *P. guildinii* feeding resulted in the deepest seed damage while *D. melacanthus* feeding resulted in the shallowest damage. Feeding by *E. heros* and *N. viridula* yielded intermediate values of seed damage compared to the other stink bug species. The histological damage caused by stylets penetration into the seed was characterized by the destruction of cells and by fusion and dissolving of protein bodies caused by salivary digestive enzymes. *N. viridula* showed the longest rostrum (5.9 mm) and *P. guildinii* the shortest (3.5 mm); for *D. melacanthus* and *E. heros* these values were intermediate and similar. The length and width of mandible tips were also bigger for *N. viridula* and smaller for *P. guildinii*. *E. heros* showed mandible tip length greater than *D. melacanthus*, but mandible tip width was similar. The four species of stink bugs showed a similar pattern of serration (indentation) on the mandible tips. The cross-section area of the food (Fc) and salivary (Sc) canals of 3rd rostral segment had higher values for *N. viridula* and

D. melacanthus compared to *E. heros* and *P. guildinii*. This last species presented the smallest food and salivary canal areas. However, when considering the ratio Fc/Sc, *P. guildinii* showed the highest relative value, which indicates a relatively bigger food canal. Cysteine-proteases enzymes were present in *D. melacanthus* and *N. viridula* saliva and absent in *E. heros*. For *D. melacanthus*, *E. heros* and *N. viridula* it was not observed α -amilase activity in the saliva. Carboxymethyl cellulase was not present in the saliva of these three species.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1. Duração média (\pm E.P.) dos períodos de pré-alimentação e alimentação, e área do dano superficial em sementes de soja madura por quatro espécies de pentatomídeos fitófagos (número inicial de insetos/espécie = 50)	26
Tabela 2.2. Profundidade média (\pm E.P.) do dano em sementes de soja causado pela alimentação de quatro espécies de pentatomídeos após uma sessão de alimentação de 60 min (número inicial de insetos = 250)	28

CAPÍTULO 4

Tabela 4.1. Médias (\pm E.P.) do comprimento do rostro, do comprimento da ponta e da largura das mandíbulas e número de dentes de pentatomídeos fêmeas adultas tenerais (< 1 dia) (número de observações em parênteses)	55
Tabela 4.2. Médias (\pm E.P.) da área do canal de alimento e do canal de saliva, e razão dos canais (Ca/Cs) no terceiro segmento do rostro de pentatomídeos fêmeas adultas tenerais (< 1 dia) (número de observações em parênteses)	57

CAPÍTULO 5

Tabela 5.1. Desgaste mandibular em fêmeas adultas de <i>Euschistus heros</i> de diferentes idades alimentadas em dieta natural e em dieta artificial (número de indivíduos examinados em parênteses)	67
---	----

Tabela 5.2. Valores médios (\pm E.P.) da força necessária para penetrar dietas natural e artificial oferecidas para fêmeas adultas de <i>Euschistus heros</i> em laboratório (número de amostras testadas entre parênteses)	71
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1. Aparelho bucal picador-sugador de Hemiptera. Vista lateral (A) e frontal da cabeça de um hemíptero (B). Secção esquemática longitudinal da cabeça e do aparelho bucal de um pentatomídeo durante a alimentação (C). Secção esquemática transversal dos estiletes (D). Secção transversal do terceiro segmento do lábio de *Nezara viridula* (E) mostrando as mandíbulas direita (MdD), mandíbula esquerda (MdE), maxila direita (Mxd), maxila esquerda (MxE), canal de alimento (Ca) e canal de saliva (Cs). Figura A-D, baseada em Davies (1988). Figura E, baseada em Depieri *et al.* (2010). Aumento 400x 6

CAPÍTULO 2

Fig. 2.1. Câmara de criação de percevejos no Laboratório de Bioecologia de Percevejos, Embrapa Soja, Londrina-PR 19

Figura 2.2. Arenas para observação da alimentação de percevejos pentatomídeos em sementes de soja (A); *Nezara viridula* alimentando-se de semente de soja hidratada (B) 18

Figura 2.3. Danos em sementes de soja causados pela alimentação de percevejos pentatomídeos (áreas esbranquiçadas). Sementes processadas com cloreto de tetrazólio para corar áreas metabolicamente ativas (áreas avermelhadas) (Foto - J. B. França-Neto) 20

Figura 2.4. Dano em profundidade (área circundada) em sementes de soja causados pela alimentação de percevejos pentatomídeos. Seta indica profundidade da região lesionada (vista em corte transversal). 21

Figura 2.5. Bloco de resina contendo porção de semente de soja em ultramicrotomo equipado com navalha de vidro (A). Lâmina histológica com cortes de semente de soja sendo corados com azul de toluidina em placa aquecedora ($\approx 45^{\circ}\text{C}$) (B) 23

Figura 2.6. Bloco de resina contendo porção de semente de soja em ultramicrotomo equipado com navalha de diamante (A). Contrastação de cortes ultrafinos dispostos em telas de cobre de 200 *mesh* com acetato de uranila 2% (B) e com citrato de chumbo em solução de Reynolds (C)..... 24

Figura 2.7. Relação do tempo de alimentação e área do dano em sementes maduras e hidratadas de soja causado por diferentes espécies de pentatomídeos em laboratório. *Dichelops melacanthus* (A); *Euschistus heros* (B); *Nezara viridula* (C); e *Piezodorus guildinii* (D) 27

Figura 2.8. Tecido endospermático de semente de soja madura danificado por percevejos pentatomídeos. *Dichelops melacanthus* (A, B); *Euschistus heros* (C, D); *Nezara viridula* (E, F); e *Piezodorus guildinii* (G, H). Canal formado pela perfuração dos estiletes (PC); fusão de corpos de proteína (PBf); dissolução de corpos de proteína (PBd) 30

Figura 2.9. Células do endosperma de sementes de soja madura. Células de semente sem dano (A); células de semente danificada por *Dichelops melacanthus* (B); *Euschistus heros* (C); *Nezara viridula* (D); e *Piezodorus guildinii* (E, F). Parede celular (CW); corpo de proteína (PB); fusão de corpos de proteína (PBf); corpo de proteína dissolvido (PBd). Setas abertas indicam esferossomos; setas fechadas indicam retração da membrana celular 32

CAPÍTULO 3

Figura 3.1. Cuba de gelo contendo amostras de cabeças de *Nezara viridula* imersas em EDTA 7% para irradiação por micro-ondas 40

Figura 3.2. Diagrama geral da estrutura do aparelho bucal de um pentatomídeo (A), e secção transversal dos estiletes no 3º segmento do lábio (B). CA = canal de alimento; CS = canal de saliva; MdE = mandíbula esquerda; MdD = mandíbula direita; MxE = maxila esquerda; MxD = maxila direita [A = baseado em Costa Lima (1940); B = baseado em Brozek & Herczek (2004)]..... 41

Figura 3.3. Secções transversais do lábio de *Nezara viridula*. Primeiro segmento do lábio sem tratamento com EDTA e irradiação com micro-ondas, mostrando partes quebradas dos estiletes (mandíbulas e maxilas) (A); terceiro segmento do lábio tratado com EDTA 7% p/v por 0,5 h em micro-ondas, com estruturas de quitina e tecidos adjacentes preservados (B); segundo segmento do lábio tratado com EDTA por 2 h em micro-ondas, com estiletes e tecidos danificados (C); segundo segmento labial tratado por 5 h com EDTA em micro-ondas com estiletes fragmentados (D). CA = canal de alimento; CS = canal de saliva; MdE = mandíbula esquerda; MdD = mandíbula direita; MxE = maxila esquerda; MxD = maxila direita. Aumento $\approx 400\times$ 42

CAPÍTULO 4

Figura 4.1. Ponta da mandíbula de *Dichelops melacanthus*; comprimento da ponta da mandíbula (a); largura da ponta da mandíbula (b); 1, 2, 3 e 4 = dentes centrais; 1', 2' e 3' = dentes laterais. Microscopia eletrônica de varredura, aumento 1.200x 49

Figura 4.2. Diagrama geral da secção transversal dos estiletes no terceiro segmento do rostro de Heteroptera; maxilas com três junções. Ca = canal de alimento, Cs = canal de saliva, MxD = maxila direita, MxE = maxila esquerda, MdD = mandíbula direita, MdE = mandíbula esquerda, CN = canal neural, A = processo superior reto direito da junção dorsal, A' = processo superior "em gancho" esquerdo da junção dorsal, B = processo inferior "em gancho" direito da junção dorsal, B' processo inferior "em gancho" esquerdo da junção dorsal, C =

processo superior reto direito da junção média, C' = processo superior "em gancho" esquerdo da junção média, D = processo superior "em T" direito da junção média, D' = processo inferior "em gancho" esquerdo da junção média, E = processo direito da junção ventral, E' = processo superior esquerdo da junção ventral, F' = processo inferior esquerdo da junção ventral. Baseado em Brozek & Herczek (2004) 51

Figura 4.3. Ponta dos estiletes mandibulares de pentatomídeos fitófagos; *Dichelops melacanthus* (A); *Euschistus heros* (B); *Nezara viridula* (C); *Piezodorus guildinii* (D). Microscopia eletrônica de varredura, aumento 600x 54

Figura 4.4. Secção transversal do terceiro segmento do rostró. *Dichelops melacanthus* (A); *Euschistus heros* (B); *Nezara viridula* (C); e *Piezodorus guildinii* (D). Canal de alimento e canal de saliva (Ca, Cs) e detalhes das três junções que unem as maxilas; a1, a2, a3 = junção dorsal, média e ventral em *D. melacanthus*; b1, b2, b3 = junção dorsal, média e ventral em *E. heros*; c1, c2, c3 = junção dorsal, média e ventral em *N. viridula*; e d1, d2, d3 = junção dorsal, média e ventral em *P. guildinii*. A, B, C, D = microscopia óptica, aumento de 600x; a1 - a3; b1 - b3; c1 - c3; e d1 - d3 = microscopia eletrônica de transmissão, aumento de 5.800x 58

CAPÍTULO 5

Figura 5.1. Diagrama da vista lateral da ponta da mandíbula de *Euschistus heros*. Comprimento total da área com dentes (a); comprimento do dente distal (1º dente) (b); altura do 2º dente (c) 65

Fig. 5.2. Ponta da mandíbula de fêmea adulta de *Euschistus heros*. Adulto tenar (< 1 dia) (A); adulto com 30 dias alimentado com dieta natural (B); adulto com 60 dias alimentado com dieta natural (C); adulto com 60 dias alimentado com dieta artificial (D). Microscopia eletrônica de varredura, aumento de 1.200x 68

Figura 5.3. Relação entre a força necessária para penetrar dietas natural e artificial usadas para alimentar fêmeas adultas de *Euschistus heros* em laboratório e o comprimento total da ponta da mandíbula. ADDF = dieta artificial; SSM3 = semente de soja após três dias de exposição; GBPF = vagem verde fresca de feijão; GBP3 = vagem verde de feijão após três dias de exposição; RSP3 = semente de amendoim após três dias de exposição; RSPF = semente de amendoim fresca; SSMF = semente de soja fresca; EHAT = Adulto teneral de *E. heros*; EH30 = *E. heros* alimentado por 30 dias com dieta natural; EHAT = *E. heros* alimentado por 60 dias em dieta artificial; e EH60 = *E. heros* alimentado por 60 dias em dieta natural 72

CAPÍTULO 6

Figura 6.1. Mecanismo da digestão da celulose. Quebra das ligações não-covalentes presentes na estrutura cristalina da celulose pela endocelulase (a); hidrólise da cadeia polissacarídica em dissacarídeos pela exocelulase (b); hidrólise dos dissacarídeos em glicose pela β -glucosidase (c) (baseado em Nation 2002) 78

Figura 6.2. Coleta de saliva do percevejo pentatomídeo *Euschistus heros* com capilar graduado. 79

Figura 6.3. Atividade de α -amilase da saliva de *Dichelops melacanthus* (A, B), *Euschistus heros* (C, D) e *Nezara viridula* (E, F). Insetos alimentados, diluição da saliva em solução de amido em colchetes abertos 82

Figura 6.4. Atividade de α -amilase da saliva de *Dichelops melacanthus* (A), *Euschistus heros* (B) e *Nezara viridula* (C). Insetos em jejum por 24 h.. Saliva diluída 20x em solução de amido 83

Figura 6.5. Atividade de cisteína-proteases (Catepsina L) da saliva de *Dichelops melacanthus* em diferentes diluições. A = 10x; B = 20x; C = 100 x; D = 500x. Insetos alimentados 84

- Figura 6.6.** Atividade de cisteína-proteases (Catepsina L) da saliva de *Euschistus heros* em diferentes diluições. A = 10x; B = 20x; C = 100 x; D = 500x Insetos alimentados 85
- Figura 6.7.** Atividade de cisteína-proteases (Catepsina L) da saliva de *Nezara viridula* em diferentes diluições. A = 10x; B = 20x; C = 100 x; D = 500x. Insetos alimentados 86
- Figura 6.8.** Atividade de cisteína-proteases (Catepsina L) da saliva de *Dichelops melacanthus* (A); *Euschistus heros* (B); e *Nezara viridula* (C). Insetos em jejum, diluição da saliva em colchetes abertos 87
- Figura 6.9.** Atividade de carboximetil-celulase da saliva de *Dichelops melacanthus* (A); *Euschistus heros* (B); e *Nezara viridula* (C). Insetos em jejum. Saliva diluída 7x 88

CAPÍTULO 1

Introdução geral

1.1. Introdução

O filo Arthropoda abrange aproximadamente 85% das espécies do Reino Animal, agrupadas em diversas classes (Gallo *et al.* 2002, Ruppert *et al.* 2003). A Classe Insecta (Hexapoda) é considerada a maior e a mais bem sucedida do filo Arthropoda, representando 73% das espécies de invertebrados e 83% das espécies dos artrópodes (Maranhão 1977).

Os insetos constituem um dos grupos que mais tiveram ampla irradiação adaptativa, possibilitando que ocupassem quase todos os habitats terrestres e aquáticos. Frequentemente, vivem onde poucos animais ou plantas conseguem sobreviver (Ruppert *et al.* 2003). Duas hipóteses foram propostas para explicar como as unidades ecológicas (guildas alimentares) expandiram evolutivamente. De acordo com a hipótese de saturação ecológica (May 1981) o número de nichos que poderiam ser ocupados pelas espécies de insetos é relativamente constante. Uma nova espécie somente poderia se estabelecer se outra fosse excluída por competição e se tornasse extinta. Strong *et al.* (1984) rejeitaram essa hipótese em relação às comunidades de insetos fitófagos, e propuseram a hipótese de expansão dos recursos. Nessa hipótese, o aumento da diversidade das plantas possibilita o aumento da diversidade de insetos.

A fitofagia está presente em aproximadamente 45% das espécies de insetos, embora nenhuma espécie de planta em seu ambiente seja atacada por todas as espécies de insetos fitófagos (Thorsteinson 1960). Dethier (1976) demonstrou que os insetos fitófagos só podem viver associados com plantas ou partes de plantas nas quais apresentam tolerância aos seus componentes de defesa.

A interação entre insetos e plantas levou ao longo da evolução ao desenvolvimento de mecanismos de defesa contra o ataque de pragas (Gatehouse *et al.* 1990). Estudos têm revelado que as plantas defendem-se de insetos e patógenos produzindo compostos químicos que os repelem e/ou intoxicam. Alguns desses compostos, especialmente proteínas, cujas concentrações podem variar em resposta ao ataque pelas pragas, também poderiam inibir a atividade das enzimas digestivas dos insetos (Maugh 1982). O conhecimento da distribuição das enzimas na saliva e ao longo do tubo digestivo dos insetos permite inferir a facilidade de acesso do inibidor às diferentes enzimas. Isso poderá orientar a seleção de variedades de plantas economicamente interessantes capazes de produzir inibidores das enzimas mais acessíveis e eficazes, tornando-as mais resistentes às pragas.

Embora a utilização de genes que levam à expressão de proteínas potencialmente tóxicas estejam sendo estudadas, e muitas delas terem sido inseridas em plantas de interesse econômico, tornando-as resistentes a insetos-praga (Vaeck *et al.* 1987; Hilder *et al.* 1987), uma desvantagem dessa tecnologia é o alto nível de proteína requerido para afetar o inseto (Brunke & Meeusen 2001). Contudo, um maior conhecimento das enzimas digestivas dos insetos possibilitaria ao desenvolvimento de inibidores específicos que poderiam ser usados como uma nova geração de inseticidas.

1.2. Pentatomídeos fitófagos e os danos em soja

A soja [*Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae)] é a mais importante oleaginosa cultivada no mundo e uma das *commodities* que mais geram divisas para o Brasil. Sua exploração econômica é prejudicada por vários problemas fitossanitários, destacando-se os percevejos pentatomídeos, que se encontram entre as principais pragas da cultura (Panizzi & Slansky 1985, Gazzoni *et al.* 1998, Lustosa *et al.* 1999). A maioria desses insetos causa danos à soja

com a introdução do aparelho bucal nas vagens. Ao atingirem as sementes, danificam diretamente os tecidos, tornando-as chochas e enrugadas, afetando, conseqüentemente, a produção e a qualidade dos grãos, além de afetarem a germinação e vigor das sementes (Panizzi & Slansky 1985, Corrêa-Ferreira *et al.* 2009). A punção facilita a contaminação dos grãos por patógenos, e pode ainda causar distúrbios fisiológicos, como atraso na maturação, retenção foliar e desenvolvimento anormal de folículos e vagens (Daugherty *et al.* 1964, Todd & Herzog 1980, Boethel *et al.* 2000, Hori 2000).

O papel da saliva dos hemípteros e das enzimas salivares é fundamental para a compreensão da etiologia dos danos que esses insetos causam às plantas. Os pentatomídeos fitófagos ao se alimentarem das sementes, injetam saliva contendo enzimas digestivas e sugam o conteúdo liquefeito (Todd & Herzog 1980). O excesso de saliva ao redor do estilete solidifica-se formando uma bainha na superfície da vagem (Miles 1972). Essas bainhas indicam de forma simplificada o forrageamento dos pentatomídeos, permitindo a quantificação do número de punções por vagem (Bowling 1980, Panizzi *et al.* 1995, Santos 2003).

Estudos iniciais da morfologia dos estiletes foram conduzidos por Santos (2003), entretanto não houve relação clara entre as dentições presentes na mandíbula e os danos causados pelos percevejos.

Dentro do mesmo nível populacional, *Piezodorus guildinii* (West.) é a espécie mais prejudicial, seguida por *Nezara viridula* (L.) e *Euschistus heros* (F.) (Corrêa-Ferreira & Azevedo 2002, Sosa-Gomez *et al.* 2004). O maior dano de *P. guildinii* pode ser pelo comportamento de inserção e retirada dos estiletes que podem causar maior lesão às paredes celulares, em comparação às outras espécies de pentatomídeos, mas isso não está provado. Sabe-se que o modo de inserção e retirada dos estiletes está associado a diferentes níveis de destruição de tecidos (Cohen 1996). Espécies pertencentes ao gênero *Dichelops* são

encontradas atacando os grãos de soja, em menor abundância. No entanto, a expansão do sistema de semeadura direta e do cultivo do milho safrinha desencadearam o crescimento populacional dessas espécies, especialmente de *D. melacanthus* (Dallas) (Panizzi 1997). *Edessa meditabunda* (F.) é praga secundária em muitas espécies de solanáceas e fabáceas (Silva *et al.* 1968, Rizzo 1971), incluindo a soja.

Panizzi & Machado-Neto (1992) relataram que o rostro de *E. meditabunda* é mais curto que os de *N. viridula*, *E. heros* e *P. guildinii*. Esse menor tamanho do aparelho bucal poderia explicar o fato das ninfas de *E. meditabunda* não conseguirem atingir a fase adulta quando alimentadas com vagens de soja (Panizzi & Machado-Neto 1992), tendo que se alimentar também das folhas do hospedeiro para completar seu desenvolvimento (Rizzo 1971). Essa preferência de *E. meditabunda* pelos tecidos vegetativos reduz sua importância econômica (Costa & Link 1977, Galileo & Heinrichs 1979). Entretanto, devido ao comportamento de agregação das ninfas e sua alimentação frequente, *E. meditabunda* pode causar danos importantes para a planta, além de adquirir e disseminar patógenos (Panizzi & Machado-Neto 1992).

A diferença no nível de dano entre as espécies também está possivelmente associada às características bioquímicas da saliva (Cohen & Wheeler 1998), à transmissão de fitopatógenos, como *Nematospora coryli* Peglion, e ao comportamento de alimentação (Sosa-Gomez & Moscardi 1995, Corrêa-Ferreira & Azevedo 2002), mas estas questões permanecem em aberto. A mancha de levedura da soja causada por *N. coryli* é dependente do inseto para sua transmissão. Punções simulando a alimentação do percevejo *Acrosternum hilare* (Say) não provocaram a transmissão do patógeno (Daugherty 1967). Entretanto, os relatos sobre a presença dos esporos do microrganismo no interior do aparelho digestivo dos pentatomídeos são contraditórios (Mitchell 2004). Leach & Clulo (1943) isolaram *N. coryli* na superfície de *A. hilare*, e não encontraram o microrganismo nos órgãos internos do inseto. Esses autores

observaram que o diâmetro do canal de alimento formado pelos estiletes nesse percevejo raramente excede 12 μm , enquanto que as células do fungo medem entre 10 e 20 μm , e portanto consideraram que a associação é provavelmente mecânica e externa. Contudo, Daugherty (1967) isolou o fungo de pronotos macerados e Foster & Daugherty (1969) cultivaram a levedura a partir dos estiletes, receptáculos salivares, e reto de percevejos adultos.

Assim, é necessário aprofundar os estudos sobre a morfologia dos estiletes, enzimas digestivas associadas à saliva e danos em sementes de soja por pentatomídeos, que auxiliam no desenvolvimento de novas cultivares, minimizando o impacto que essas pragas causam na produção e na qualidade das sementes.

1.3. Aparelho bucal dos insetos sugadores

O aparelho bucal dos insetos sugadores surgiu independentemente em Hemiptera, Thysanoptera e em Lepidoptera adultos (Labandeira 1997). Todavia, há o consenso que esse tipo de aparelho bucal evoluiu das estruturas presentes no aparelho bucal mastigador. O aparelho bucal primitivo consiste de um par de mandíbulas e maxilas, lábio (ventral), labro (dorsal) e hipofaringe. Em Hemiptera, o lábio e o labro se estenderam para formar uma cavidade pré-oral. A hipofaringe, parte ventral da cápsula cefálica, se estende para o interior da cavidade pré-oral entre o lábio e o labro. Os ductos das glândulas salivares se abrem no espaço entre a hipofaringe e o lábio (Nation 2002). As mandíbulas e maxilas são estiliformes, e os palpos maxilares são atrofiados. O lábio apresenta um sulco anterior que contém dois estiletes mandibulares e dois estiletes maxilares. Em heterópteros fitófagos, o lábio apresenta em sua porção distal sensilas gustativas (Schoonhoven 1968). As duas maxilas são unidas por

sulcos, formando um tubo com dois canais. O canal dorsal conduz o alimento sugado para a cavidade oral, e o canal ventral leva a saliva até o alimento presente no substrato (Figura 1.1).

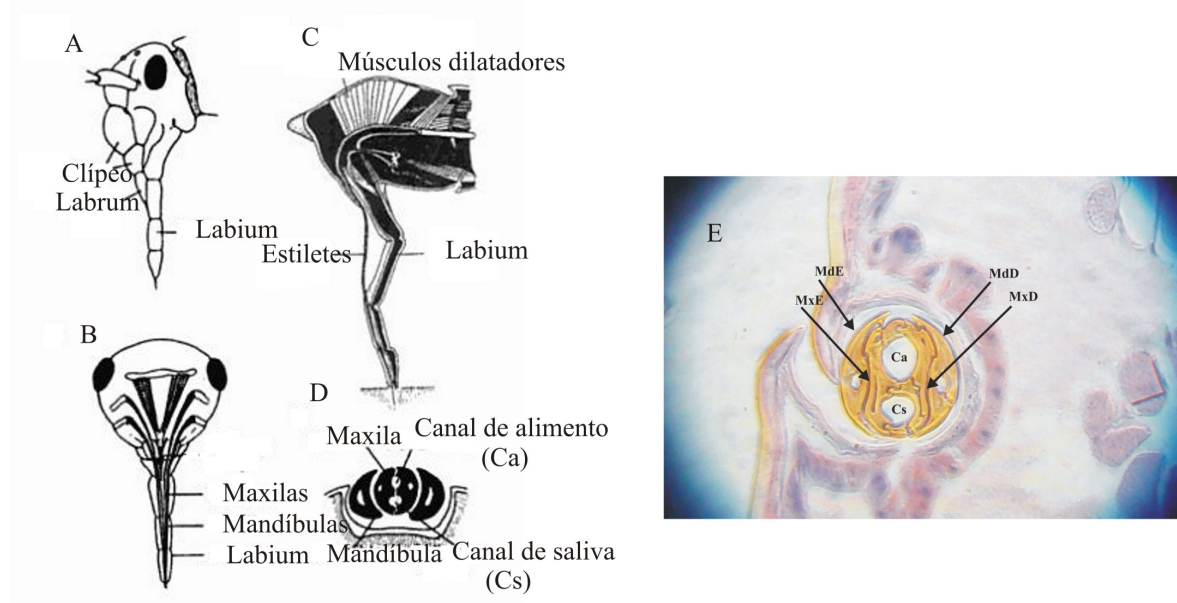


Figura 1.1. Aparelho bucal picador-sugador de Hemiptera. Vista lateral (A) e frontal da cabeça de um hemíptero (B). Secção esquemática longitudinal da cabeça e do aparelho bucal de um pentatomídeo durante a alimentação (C). Secção esquemática transversal dos estiletes (D). Secção transversal do terceiro segmento do lábio de *Nezara viridula* (E) mostrando as mandíbulas direita (MdD), mandíbula esquerda (MdE), maxila direita (MxD), maxila esquerda (MxE), canal de alimento (Ca) e canal de saliva (Cs). Figura A-D, baseada em Davies (1988). Figura E, baseada em Depieri *et al.* (2010). Aumento 400x.

O formato da ponta dos estiletes, dentição da ponta das mandíbulas, filtros com cerdas das maxilas, e o tamanho do canal de alimento em relação aos hábitos alimentares têm sido abordados (Fauchaux 1975, Cobben 1978, Cohen 1990). Os estiletes mantêm-se unidos por junções do tipo canal-crista, que se estendem quase por todo comprimento das maxilas (Cobben 1978, Cohen 2000). Todavia, pouco se conhece a respeito das dimensões da ponta da

mandíbula, morfologia de sua dentição, e sua relação com os danos observados nas plantas. Após os estiletes serem inseridos no tecido vegetal eles podem ser orientados em diferentes direções provocando lise dos tecidos através do rompimento de paredes e membranas celulares (Schoonhoven *et al.* 2005).

O presente estudo buscou elucidar o dano em sementes de soja causado por diferentes espécies de pentatomídeos fitófagos, considerando as seguintes hipóteses:

- 1) A duração do período da alimentação tem influência na área do dano em sementes de soja;
- 2) As dimensões da ponta dos estiletes e a área da secção transversal do canal de alimento e do canal de saliva das diferentes espécies de percevejos causam danos diferenciais em sementes de soja;
- 3) Enzimas digestivas presentes na saliva são possivelmente responsáveis pela maior parte dos danos nas sementes de soja.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo geral

Avaliar os danos causados em sementes de soja pelos percevejos pentatomídeos *Dichelops melacanthus* (Dallas), *Euschistus heros* (F.), *Nezara viridula* (L.) e *Piezodorus guildinii* (West.) em relação à morfologia dos estiletes e às enzimas salivares.

1.4.2. Objetivos específicos

- Avaliar os danos celulares em sementes de soja causados pelas espécies *D. melacanthus*, *E. heros*, *N. viridula* e *P. guildinii* e medir a área e a profundidade dos danos nos tecidos atacados;
- Comparar a morfologia da dentição mandibular, a ultraestrutura das junções das maxilas e a área da secção transversal dos canais de saliva e de alimento das espécies *D. melacanthus*, *E. heros*, *N. viridula* e *P. guildinii*;
- Desenvolver nova metodologia para a preparação do aparelho bucal de hemípteros para análises em microscopia óptica e eletrônica de transmissão;
- Analisar o desgaste das dentações mandibulares em adultos de *E. heros* de diferentes idades alimentados em dieta natural e artificial;
- Avaliar a presença das enzimas α -amilase, cisteína-proteases e carboximetil celulase na saliva de *D. melacanthus*, *E. heros* e *N. viridula*.

1.5. Literatura citada

Boethel, D. J., Russin, J. S., Wier, A. T., Layton, M. B., Mink, J. S. & M. L. Boyde. 2000.

Delayed maturity associated with southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) injury at various soybean phenological stages. J. Econ. Entomol. 93: 707-712.

Bowling, C. C. 1980. The stylet sheath as an indicator of feeding activity by the Southern green stink bug on soybeans. J. Econ. Entomol. 73: 1-3.

- Brunke, K. J. & R. L. Meeusen. 2001.** Insect control with genetically engineered crops. *Trends Biotechnol.* 9: 197-200.
- Cobben, R. H. 1978.** Evolutionary trends in Heteroptera. Part II. Mouthpart-structures and feeding strategies. Wageningen, Mededelingen Landbouwhogeschool. 78-5.
- Cohen, A. C. 1990.** Feeding adaptations of some predaceous Hemiptera. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 83: 1215-1223.
- Cohen, A. C. 1996.** Plant feeding by predatory Heteroptera: evolutionary and adaptational aspects of trophic switching. pp. 1-17 *In* Alomar, O. & R. N. Wiedenmann (eds.). *Zoophytophagous Heteroptera: implications for life history and integrated pest management.* Lanham, Entomological Society of America.
- Cohen, A. C. & A. G. Wheeler Jr. 1998.** Role of saliva in the highly destructive fourlined plant bug (Hemiptera: Miridae: Mirinae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 91: 94-100.
- Cohen, A. C. 2000.** How carnivorous bugs feed. pp. 563-570 *In* Schaefer, C. W. & A. R. Panizzi (eds.). *Heteroptera of economic importance.* Boca Raton, CRC Press.
- Corrêa-Ferreira, B. S. & J. D. Azevedo. 2002.** Soybean seed damage by different species of stink bugs. *Agri. Forest. Entomol.* 4: 145-150.
- Corrêa-Ferreira, B. S. Krzyzanowski, F. C., & C. A. Minami. 2009.** Percevejos e qualidade da semente de soja. Londrina, Embrapa Soja, Circular Técnica 67.

- Costa, E. C. & D. Link. 1977.** Danos causados por algumas espécies de Pentatomidae em duas variedades de soja. Rev. Centr. Cien. Rur. 7: 199-206.
- Daugherty, D. M., Neustadt, M. H., Gehrke, C. W., Cabaña, L. E., Williams. L. F. & D. E. Green. 1964.** An evaluation of damage to soybean by brown and green stink bugs. J. Econ. Entomol. 57: 719-722.
- Daugherty, D. M. 1967.** Pentatomidae as vectors of leaf spot disease of soybeans. J. Econ. Entomol. 60: 147-152.
- Davies, R. G. 1988.** Outlines of entomology. 7 ed. London, Chapman & Hall.
- Depieri R. A., Andrade C. G. T. J. & A. R. Panizzi. 2010.** A new methodology for processing mouthparts of hemipterans (Hemiptera) for microscopic study. Micron 41: 169-171.
- Dethier, V. G. 1976.** The hungry fly: A physiological study of the behavior associated with feeding. Cambridge, Harvard University Press.
- Faucheux, M. M. 1975.** Relations entre l'ultrastructure des stylets mandibulaires et maxillaires et la prise de nourriture chez les Insectes Hemipteres. C. R. Acad. Sci. Paris (Ser. D) 281: 41-44.

- Foster, J. E. & D. M. Daugherty. 1969.** Isolation of the organism causing yeast-spot disease from the salivary system of the green stink bug. *J. Econ. Entomol.* 62: 424-427.
- Galileo, M. H. M. & E. A. Heinrichs. 1979.** Danos causados à soja em diferentes níveis e épocas de infestação durante o crescimento. *Pesq. Agropec. Brasil.* 14: 279-282.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira-Neto, S., Carvalho, R. P. L., Baptista, G. C., Berti-Filho, E., Parra, J. R. P., Zucchi, R. A., Alves, S. B., Vendramin, J. D., Marchini, L. C., Lopes, J. R. S. & C. Omoto. 2002.** *Entomologia agrícola*. Piracicaba, FEALQ.
- Gatehouse, A. M. P., Boulter, D., Gly, E. A., Gatehouse, J. A. & V. A. Hilder. 1990.** Additive protective effects of different plant-derived insect resistance genes in transgenic tobacco plants. *Crop Protection* 9: 351-354.
- Gazzoni, D., Oliveira, E. D., Corso, I. C., Corrêa-Ferreira, B. S., Villas Bôas, G. L., Moscardi, F. & A. R. Panizzi. 1998.** Manejo de pragas de soja. *Circ. Téc. EMBRAPA-CNPSO*, n.5.
- Hilder, V. A., Gatehouse, A. M. P., Sherman, S. E. & R. F. Baker. 1987.** A novel mechanism of insect resistance engineering in tobacco. *Nature* 330: 160-163.
- Hori, K. 2000.** Possible causes of disease symptoms resulting from the feeding of phytophagous Heteroptera. pp. 11-35 *In* Schaefer, C. W. & A. R. Panizzi (eds.). *Heteroptera of economic importance*. Boca Raton, CRC Press.

- Labandeira, C. C. 1997.** Insect mouthparts: ascertaining the paleobiology of insect feeding strategies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28: 153-193.
- Leach, J. G. & G. Clulo. 1943.** Association between *Nematospora phaseoli* and the green stink bug. *Phytopathology* 33: 1209-1211.
- Lustosa, P. R., Zanuncio, J. C., Leite, G. L. D. & M. Picanço. 1999.** Qualidade da semente e senescência de genótipos de soja sob dois níveis de infestação de percevejos (Pentatomidae). *Pesq. Agropec. Bras.* 34: 1347-1351.
- Maranhão, Z. C. 1977.** Entomologia geral. 2. ed. São Paulo, Nobel.
- Maugh, T. H. 1982.** Exploring plant resistance to insects. *Science* 216: 722-723.
- May, R. M. 1981.** Theoretical ecology: principles and applications. Oxford, Oxford Scientific Publications.
- Miles, P. W. 1972.** The saliva of Hemiptera. *Adv. Insect Physiol.* 9: 183-256.
- Mitchell, P. L. 2004.** Heteroptera as vectors of plant pathogens. *Neotrop. Entomol.* 33: 519-545.
- Nation, J. L. 2002.** Insect physiology and biochemistry. Boca Raton, CRC Press.

- Panizzi, A. R. & F. Slansky Jr. 1985.** Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. *Florida Entomol.* 68: 184-214.
- Panizzi, A. R. & E. Machado-Neto. 1992.** Development of nymphs and feeding habits of nymphal and adult *Edessa meditabunda* (Heteroptera: Pentatomidae) on soybean and sunflower. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 85: 477-481.
- Panizzi, A. R., Niva, C. C. & E. Hirose. 1995.** Feeding preference by stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae) for seeds within soybean pods. *J. Entomol. Sci.* 30: 333-341.
- Panizzi, A. R. 1997.** Entomofauna changes with soybean expansion in Brazil. pp.166-169 *In* Napompeth, B. (ed.). *Proc. World Soybean Res. Conf.* Bangkok, Kasetsart University Press.
- Rizzo, H. F. E. 1971.** Aspectos morfológicos y biológicos de *Edessa meditabunda* (F.) (Hemiptera, Pentatomidae). *Rev. Per. Entomol.* 14: 272-281.
- Ruppert, E. E, Barnes, R. D. & R. S. Fox. 2003.** Invertebrate zoology: a functional evolutionary approach. 7. ed. Florence, Cengage Learning.
- Santos, C. H. 2003.** Suscetibilidade da soja, *Glycine max* (L.) Merr. aos danos causados por *Nezara viridula* (L.), *Euschistus heros* (Fabr.), *Piezodorus guildinii* (West.) (Heteroptera: Pentatomidae) e *Neomegalotomus parvus* West. (Heteroptera: Alydidae). Curitiba: UFPR, Tese de Doutorado.

- Schoonhoven, L. M. 1968.** Chemosensory bases of host plant selection. *Annu. Rev. Entomol.* 13: 115-136.
- Schoonhoven, L. M., Loon, J. J. A. & M. Dicke. 2005.** *Insect-plant biology.* Oxford, Oxford University Press.
- Silva, A. G., Gonçalves, C. R., Galvão, D. M., Gonçalves, A. J. L., Gomes, J., Silva, M. N. & L. Simone. 1968.** Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil: seus parasitas e predadores. Rio de Janeiro: Min. de Agri. Depto. de Def. e Inspeção Agropecuária.
- Sosa-Gomez, D. R., Delfin, K. E., Almeida, A. M. R. & E. Hirose. 2004.** Genetic differentiation among Brazilian population of *Euschistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae) based on RAPD analysis. *Neotrop. Entomol.* 33: 179-187.
- Sosa-Gomez, D. R. & F. Moscardi. 1995.** Retenção foliar diferencial em soja provocada por percevejos (Heteroptera: Pentatomidae) *An. Soc. Entomol. Brasil.* 24: 414-404.
- Strong, D. R., Lawton, J. & T. R. E. Southwood. 1984.** *Insects on plants: Community patterns and mechanisms.* Oxford, Blackweel Scientific Publications.
- Thorsteinson, A. J. 1960.** Host selection in phytophagous insects. *Annu. Rev. Entomol.* 5: 193-218.

Todd, J. W. & D. C. Herzog 1980. Sampling phytophagous Pentatomidae on soybean. pp. 438-478 *In* Kogan, M. & D. C. Herzog, D.C. (eds.). Sampling methods in soybean entomology. New York, Springer.

Vaeck, M., Reynarerts, A., Hofte, J. S., De Beuckleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Montagu, M. & J. C. Leemans. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328: 33-37.

CAPÍTULO 2

Duração dos períodos de pré-alimentação e alimentação, e área e profundidade de danos em sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merr.] (Fabaceae) causados por pentatomídeos fitófagos

Depieri R. A. & A. R. Panizzi. Duration of feeding and superficial and in-depth damage to soybean seed by selected species of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). Florida Entomologist (submetido).

2.1. Introdução

Os percevejos pentatomídeos são considerados como uma das principais pragas da soja [*Glycine max* (L.) Merr.] (Fabaceae) em várias partes do mundo (Turnipseed & Kogan 1976, Panizzi & Slansky 1985, Kogan & Turnipseed 1987). Por se alimentarem dos grãos, afetam seriamente o seu rendimento e a sua qualidade. Ao provocarem a murcha e má formação dos grãos e vagens, a planta de soja não amadurece normalmente, permanecendo verde na época da colheita.

Entre as mais de 50 espécies conhecidas por atacar a cultura, o percevejo verde, *Nezara viridula* (L.) talvez seja a espécie mais estudada e de maior importância econômica. Outras espécies como o percevejo marrom, *Euschistus heros* (F.) e o percevejo verde pequeno, *Piezodorus guildinii* (West.) são também pragas importantes nas áreas de maior produção de soja no mundo, i.e., a América do Sul (Panizzi *et al.* 2000). Uma quarta espécie, o percevejo de barriga verde, *Dichelops melacanthus* (Dallas), ocasionalmente encontrado na soja, recentemente tornou-se uma importante praga no trigo e milho (Chocorosqui & Panizzi 2004, 2008).

Hemípteros fitófagos utilizam estratégia de laceração e injeção para se alimentarem, envolvendo o uso dos seus estiletes e da saliva produzida pelas glândulas salivares (Miles 1972, Hori 2000). Os adultos e ninfas perfuram e cortam os tecidos vegetais com um par de estiletes externos (mandíbulas) e injetam saliva contendo enzimas digestivas através do canal de saliva, formado pelos estiletes internos (maxilas). Os tecidos liquefeitos pela saliva são ingeridos através do canal alimentar nas maxilas e passam para o sistema digestório onde são, posteriormente, digeridos e absorvidos (Cohen 2000).

Embora o impacto da alimentação dos percevejos nas sementes de soja tenha sido estudado por vários autores (Miner 1966, Todd & Turnipseed 1974, Vicentini & Jimenez 1977, Panizzi *et al.* 1979, Brier 1993), o dano causado em relação ao comportamento alimentar entre as espécies foi pouco estudado. Alguns autores compararam o dano causado às sementes de soja por diferentes espécies de percevejos (Daugherty *et al.* 1964, McPherson *et al.* 1993, Sosa-Gómez & Moscardi 1995, Côrrea-Ferreira & Azevedo 2002), mas não existe relato sobre a possível relação entre a duração do tempo de alimentação dos percevejos e o dano, e a constituição em detalhes da área de dano superficial e interna nas sementes.

Portanto, conduzimos este estudo para determinar se há uma relação entre o tempo de alimentação das espécies citadas acima, com o dano nas sementes de soja, e também para comparar a área superficial e a profundidade do dano causado pelas quatro espécies de percevejos pentatomídeos.

2.2. Material e métodos

De novembro de 2006 a março de 2007, e de dezembro de 2007 a março de 2008, adultos de *D. melacanthus*, *E. heros*, *N. viridula*, e *P. guildinii* foram coletados em áreas de cultivo de soja na área experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

(Embrapa Soja), em Londrina-PR (23° 11' latitude S, 51° 11' longitude O). No laboratório, casais ($n = 30$) de cada espécie de percevejo foram colocados em caixas plásticas (25 x 20 x 20 cm) com fundo forrado com papel filtro e foram alimentados com vagens verdes de feijão, *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae), sementes de soja e amendoim, *Arachis hypogaea* L. (Fabaceae) e frutos maduros de ligustro, *Ligustrum lucidum* Ait. (Oleaceae) e mantidos em câmara de criação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ U.R. e fotofase de 14 h, para promover a reprodução dos insetos e consequente uniformização dos adultos da colônia (Fig. 2.1).



Fig. 2.1. Câmara de criação de percevejos no Laboratório de Bioecologia de Percevejos, Embrapa Soja, Londrina-PR.

Para evitar a morte dos insetos por microrganismos e/ou envenenamento por resíduos de pesticidas, as vagens de feijão foram higienizadas com solução de água sanitária 1% (princípio ativo NaOCl 2,0 – 2,5%) por 10 min e enxaguadas em água corrente. Os alimentos fornecidos aos percevejos foram substituídos a cada dois dias.

2.2.1. Períodos de pré-alimentação e de alimentação, e área de dano superficial em sementes de soja

Para avaliar os períodos de pré-alimentação e alimentação e o dano superficial nas sementes de soja, adultos de *E. heros*, *N. viridula*, e *P. guildinii* ($n = 50$) tiveram acesso somente à água durante 24 h e foram colocados individualmente em placas de Petri (6,0 x 2,0 cm) com fundo revestido com papel filtro. Para cada inseto foi oferecida uma semente de soja (cv. BRS-257) madura e hidratada por 16 h em papel de germinação em caixas gerbox, sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, e a atividade de alimentação foi observada continuamente por 6 h a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (Fig. 2.2.A,B).

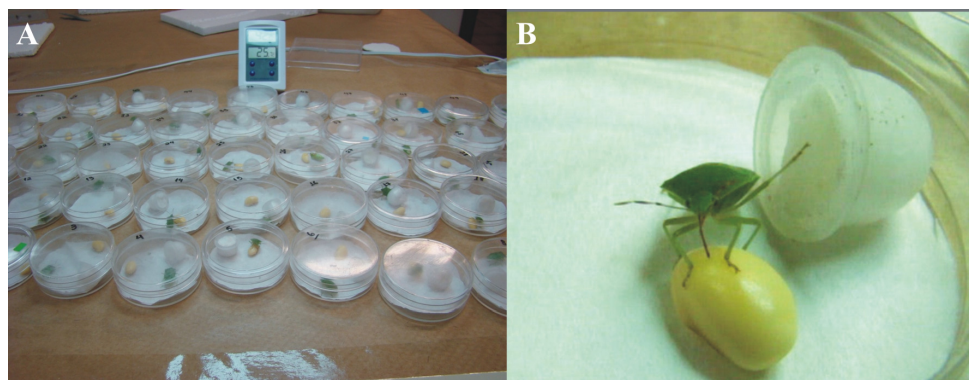


Figura 2.2. Arenas para observação da alimentação de percevejos pentatomídeos em sementes de soja (A); *Nezara viridula* alimentando-se de semente de soja hidratada (B).

O período de pré-alimentação foi caracterizado como o intervalo de tempo (min) entre o oferecimento da semente e o início da sessão de alimentação. O período de alimentação (sessão de alimentação) foi caracterizado como o intervalo de tempo (min) entre o início dos movimentos verticais da cabeça após a inserção do aparelho bucal na semente até a retirada dos estiletes.

A semente sugada foi mantida em câmara de germinação ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) por 24 h para permitir a bioatividade dos componentes da saliva. Solução de tetrazólio (2,3,5-cloreto de trifênil tetrazólio) 0,075% foi adicionada à semente e mantida em estufa a 35°C por 3 h para

obtenção de contraste entre as áreas com dano e sadia (França-Neto *et al.* 1998) (Fig. 2.3). A semente foi fotografada dentro de um quadrado de 20 x 20 mm para medição da área de dano superficial usando o programa Photop (IAPAR, Londrina-PR).

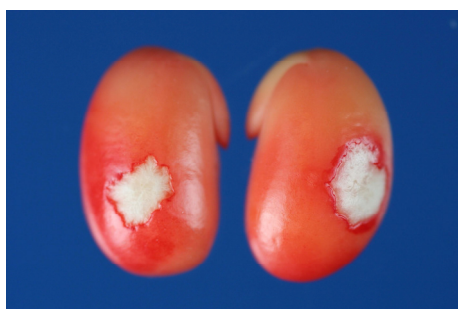


Figura 2.3. Danos em sementes de soja causados pela alimentação de percevejos pentatomídeos (áreas esbranquiçadas). Sementes processadas com cloreto de tetrazólio para corar áreas metabolicamente ativas (áreas avermelhadas) (Foto - J. B. França-Neto).

2.2.2. Profundidade do dano em sementes de soja em período de alimentação fixo

Para comparar a profundidade do dano em sementes de soja em período de alimentação fixo, adultos ($n = 250$) de *D. melacanthus*, *E. heros*, *N. viridula* e *P. guildinii* foram mantidos em jejum em presença de água por 24 h e colocados individualmente em placas de Petri (6,0 x 2,0 cm) com fundo revestido com papel filtro. Para cada inseto foi oferecida uma semente de soja madura e hidratada (cv. BRS-257). Neste teste, cada inseto sugou a semente continuamente por 60 min, para em seguida ser tratada como descrito no teste anterior. Para medir a profundidade do dano, cada semente foi cortada sob microscópio estereoscópico usando uma lâmina de barbear até o centro da área do dano, onde se mediu a profundidade do dano com ocular com escala milimétrica (Fig. 2.4).

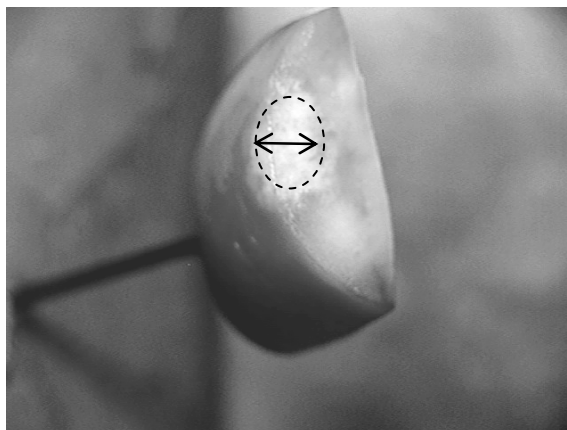


Figura 2.4. Dano em profundidade (área circundada) em sementes de soja causados pela alimentação de percevejos pentatomídeos. Seta indica profundidade da região lesionada (vista em corte transversal).

2.2.3. Danos histológicos em semente de soja

Para os estudos histológicos, a secção danificada da semente foi cortada em cubos (1 mm³) e fixada por 12 h por imersão em uma solução aquosa de glutaraldeído 3% (EMS, Hatfield, PA, EUA), paraformaldeído 2% (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ) e tampão cacodilato de sódio 0,2M, pH 7,2 (EMS, Hatfield, PA, EUA). As amostras foram enxaguadas 3 vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1M por um período total de 45 min para remoção dos resíduos dos fixadores. A pós-fixação foi feita em tetróxido de ósmio 1% (EMS, Hatfield, PA, EUA) em tampão cacodilato de sódio 0,1M durante 1 h. A desidratação das amostras foi feita em concentrações crescentes de etanol (CH₃CH₂OH – 3x 15 min 50%, 60%, 70%, 80%, 90%; 4x 10 min 100%). Os cubos de sementes desidratados foram diafanizados em óxido de propileno (1,2-epoxi-propano) (EMS, Hatfield, PA, EUA) e gradualmente infiltrados com resina Araldite 502[®] (EMS, Hatfield, PA, EUA) diluída em diferentes proporções em óxido de propileno por 5 dias, e em seguida emblocados em resina a 100%, e mantidos à 60° C por 24 h para polimerização dos blocos em forma de silicone.

Os blocos contendo porções das sementes com dano por cada espécie de pentatomídeo avaliado foram aparados para a retirada de rebarbas de resina e preparação da superfície de corte. Cortes semi-finos ($3\text{ }\mu\text{m}$) das sementes foram feitos com navalha de vidro de 45° em ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT[®], Wetzlar, Alemanha) e corados com azul de toluidina em lâminas histológicas para observar o dano no tecido do cotilédone em fotomicroscópio Zeiss Axio Imager A1[®] (Jena, Alemanha) (Fig. 2.5).

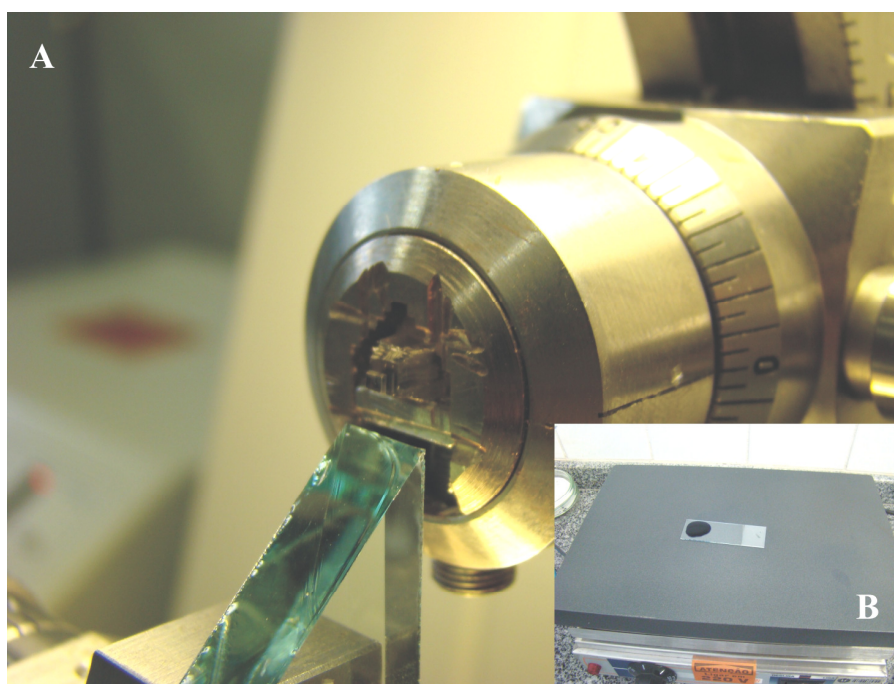


Figura 2.5. Bloco de resina contendo porção de semente de soja em ultramicrotomo equipado com navalha de vidro (A). Lâmina histológica com cortes de semente de soja sendo corados com azul de toluidina em placa aquecedora ($\approx 45^\circ\text{C}$) (B).

Para observar as células do cotilédone, as sementes foram seccionadas (70 nm) com navalha de diamante (Diatome[®] Ultra 45° , Biel, Suíça) em ultramicrotomo. Os cortes das sementes foram dispostos em telas de cobre de 200 mesh , e contrastados com acetato de uranila 2% em metanol e com solução citrato de chumbo em solução de Reynolds para obtenção de imagens em microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai T12[®] (80 Kv) (Fig. 2.6).

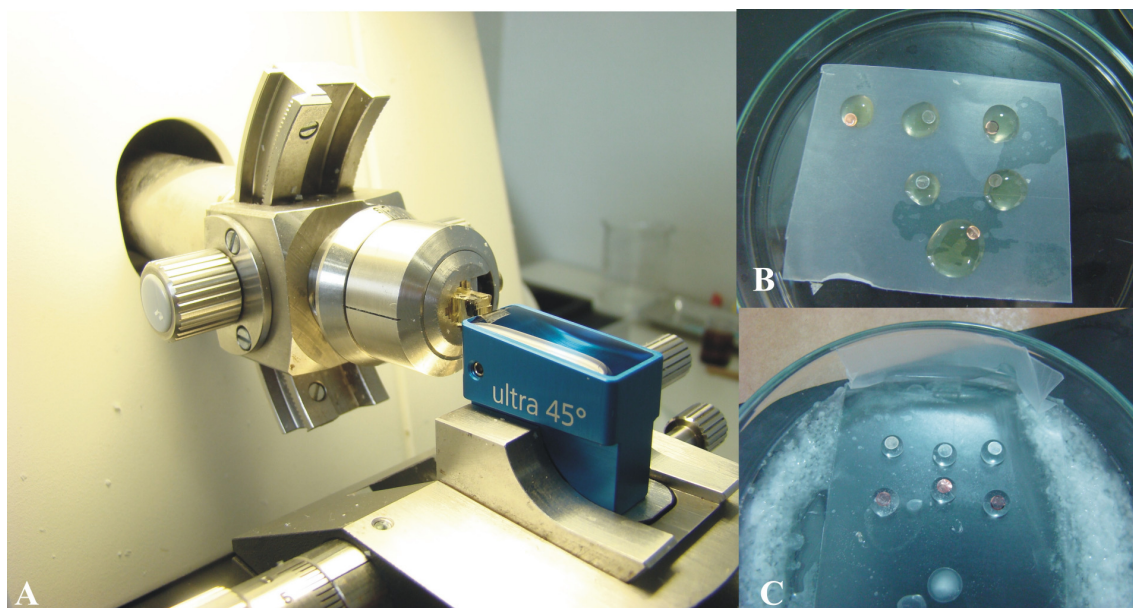


Figura 2.6. Bloco de resina contendo porção de semente de soja em ultramicrotomo equipado com navalha de diamante (A). Contrastação de cortes ultrafinos dispostos em telas de cobre de 200 *mesh* com acetato de uranila 2% (B) e com citrato de chumbo em solução de Reynolds (C).

2.2.4. Delineamento experimental e análise estatística

Todos os testes tiveram delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados da duração dos períodos de pré-alimentação e de alimentação, área e profundidade do dano e porcentagem dos insetos alimentados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) (SAS Institute Inc. 1998). Quando apropriado, médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. Períodos de pré-alimentação e alimentação e dano superficial nas sementes de soja

Embora a duração do tempo de pré-alimentação tenha variado de 103 min para *N. viridula* a 158 min para *E. heros*, não houve diferença significativa entre as espécies de percevejos ($P > 0,05$) (Tabela 2.1). Levando em consideração que os insetos foram mantidos em jejum por 24 horas antes do teste e o alimento oferecido em uma arena pequena, os tempos de pré-alimentação foram longos. Esse "atraso" para o inseto se alimentar pode ser devido ao reconhecimento lento da fonte de alimento. Na natureza, os percevejos normalmente não se alimentam de sementes de soja expostas ou hidratadas. Também, o processo da hidratação da semente em água pode ter alterado o seu cheiro e/ou sabor. Estes fatores podem explicar também a baixa porcentagem ($\leq 64\%$) de adultos de todas as espécies testadas que se alimentaram (Tabela 2.1).

O tempo de alimentação foi significativamente maior em *N. viridula* (ca. 133 min) comparado com *E. heros* e *D. melacanthus* (ca. 70 min); *N. viridula* e *P. guildinii* tiveram tempos de alimentação similares (Tabela 2.1).

Poucas informações são encontradas na literatura a respeito do tempo de alimentação de pentatomídeos adultos. Simmons & Yeargan (1988) relataram que ninfas e adultos do percevejo *Acrosternum hilare* (Say) alimentaram-se por aproximadamente 90 min em sementes de soja maduras hidratadas. Similarmente, *N. viridula* previamente jejuados se alimentaram por um tempo médio de 92,5 min em sementes nas mesmas condições (Panizzi 1995). Além disso, o tempo médio de alimentação (71,1 min) de ninfas e adultos de *Euschistus servus* (Say) em sementes verdes de feijão (Tillman & Mullinix 2004) foi similar ao observado em *E. heros*.

A área do dano superficial nas sementes variou de 4,0 mm² para *P. guildinii* a 0,3 mm² para *D. melacanthus* (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Duração média (\pm E.P.) dos períodos de pré-alimentação e alimentação, e área do dano superficial em sementes de soja madura por quatro espécies de pentatomídeos fitófagos (número inicial de insetos/espécie = 50). Dados originais em Anexo 1.1.

Espécie	Duração da pré- alimentação ¹ (min.) (X \pm E.P.)	Duração da alimentação ¹ (min.) (X \pm E.P.)	Dano superficial ¹ (mm ²) (X \pm E.P.)
<i>Dichelops melacanthus</i>	150,2 \pm 22,58 a (22) [44] ²	71,4 \pm 7,37 b (22)	0,3 \pm 0,08 d (22)
<i>Euschistus heros</i>	157,9 \pm 23,58 a (22) [44]	69,8 \pm 7,47 b (22)	1,0 \pm 0,12 c (22)
<i>Nezara viridula</i>	103,0 \pm 14,21 a (32) [64]	133,3 \pm 13,75 a (32)	2,4 \pm 0,27 b (32)
<i>Piezodorus guildinii</i>	113,2 \pm 17,41 a (30) [60]	102,7 \pm 13,02 ab (30)	4,0 \pm 0,57 a (30)

¹Médias em cada coluna seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

²Percentagem de insetos que se alimentaram em colchetes.

Foi observada correlação positiva entre o tempo de alimentação e a área de dano resultante para *E. heros*, *N. viridula* e *P. guildinii* ($R^2 > 0,80$, $P < 0,0001$ - Fig. 2.7.B,C,D). Entretanto, para *D. melacanthus* essa correlação não foi significativa ($R^2 = 0,1011$, $P = 0,1493$ - Fig 2.7.A). Esses resultados em laboratório corroboram relatos de campo. O comportamento de alimentação de *D. melacanthus* observado em laboratório é consistente com a preferência

dessa espécie por milho e trigo, culturas onde é considerado praga, sendo apenas praga ocasional para soja (Ávila & Panizzi 1995, Chocorosqui & Panizzi 2004).

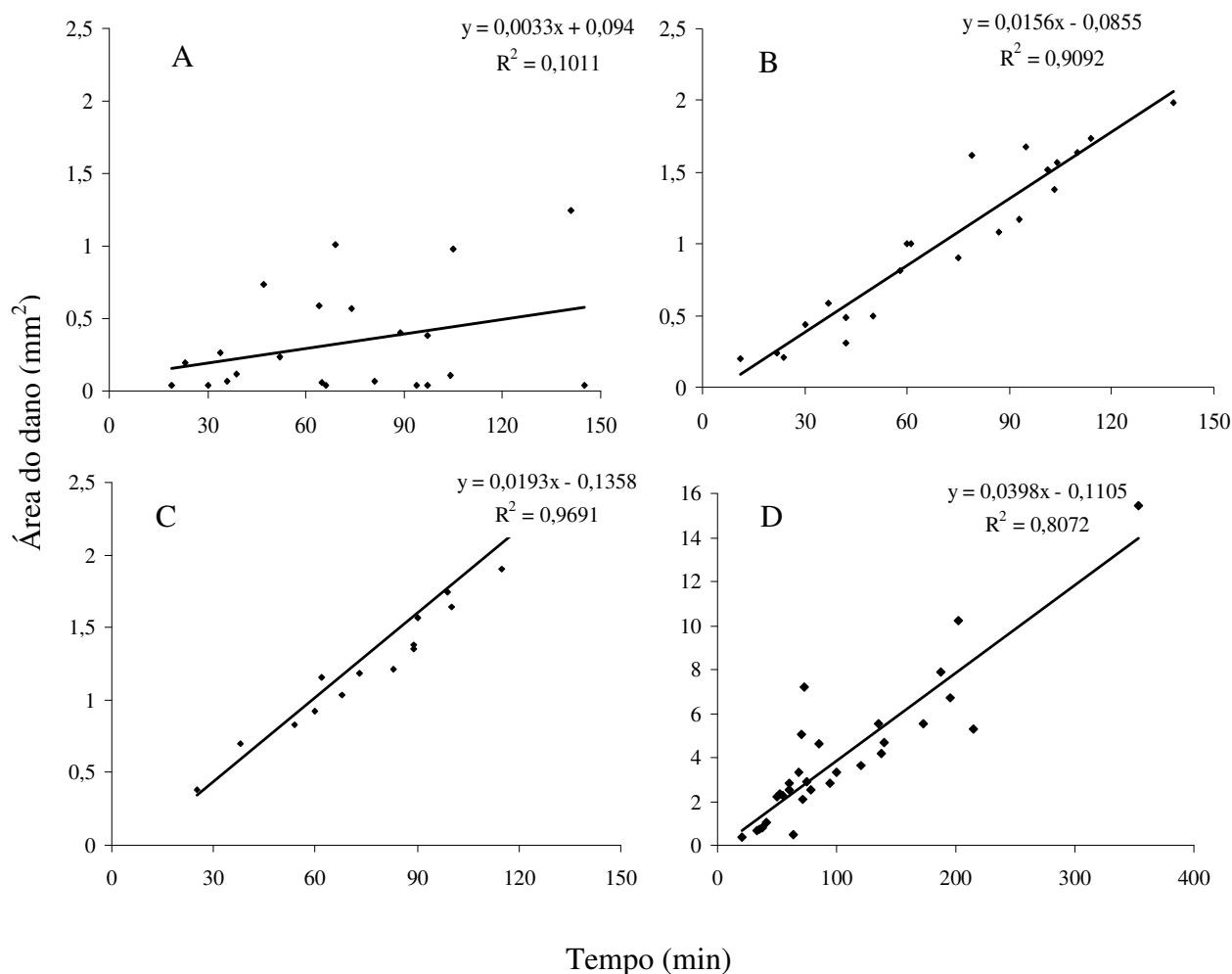


Figura 2.7. Relação do tempo de alimentação e área do dano em sementes maduras e hidratadas de soja causado por diferentes espécies de pentatomídeos em laboratório. *Dichelops melacanthus* (A); *Euschistus heros* (B); *Nezara viridula* (C); e *Piezodorus guildinii* (D).

2.3.2. Profundidade do dano em sementes de soja em tempo fixo

A profundidade do dano em sementes maduras de sojas causado pelas diferentes espécies de percevejos estudadas mostrou que *P. guildinii* resultou em dano mais profundo

nas sementes, enquanto a alimentação de *D. melacanthus* resultou em danos menos profundos em comparação com outras espécies. A alimentação de *E. heros* e *N. viridula* causaram valores intermediários de profundidade do dano (Tabela 2.2). A porcentagem de insetos que se alimentou das sementes de soja foi relativamente baixa (Tabela 2.2) confirmando o que foi observado anteriormente (ver discussão no teste anterior).

Tabela 2.2. Profundidade média (\pm E.P.) do dano em sementes de soja causado pela alimentação de quatro espécies de pentatomídeos após uma sessão de alimentação de 60 min (número inicial de insetos = 250). Dados originais em Anexo 1.2.

Espécies	Profundidade do dano (mm) ¹ ($X \pm$ E.P.)	Porcentagem dos insetos que se alimentaram ($X \pm$ E.P.) ²
<i>Dichelops melacanthus</i>	0,5 \pm 0,07 d (99)	44,4 \pm 6,27 b
<i>Euschistus heros</i>	0,8 \pm 0,06 c (133)	52,4 \pm 2,93 b
<i>Nezara viridula</i>	1,2 \pm 0,05 b (109)	68,4 \pm 3,87 a
<i>Piezodorus guildinii</i>	2,0 \pm 0,08 a (101)	41,2 \pm 1,85 b

¹Médias em cada coluna seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

²Média de cinco repetições de 50 insetos.

2.3.3. Danos histológicos em sementes

A alimentação dos percevejos pentatomídeos nas sementes de soja causou danos nos cotilédones (Figs. 2.8. A-H). O dano histológico foi caracterizado pela destruição das células

causado pela perfuração das sementes pelos estiletes e pela fusão (PBf – Fig 2.8.B) e dissolução (PBd – 1.8.H) dos corpos de proteína possivelmente causado por enzimas digestivas. Hori (2000) afirmou que as enzimas digestivas salivares afetam negativamente a fisiologia e a bioquímica dos tecidos adjacentes ao canal formado pela perfuração dos estiletes (PC – Figs. 2.8.C-G). A saliva se espalha nos tecidos, e o conteúdo celular pode ser liberado por até 3,5 mm distante do ponto de penetração dos estiletes, sugerindo maceração geral dos tecidos ou liberação do conteúdo celular por bomba osmótica (Miles 1987, Miles & Taylor 1994).

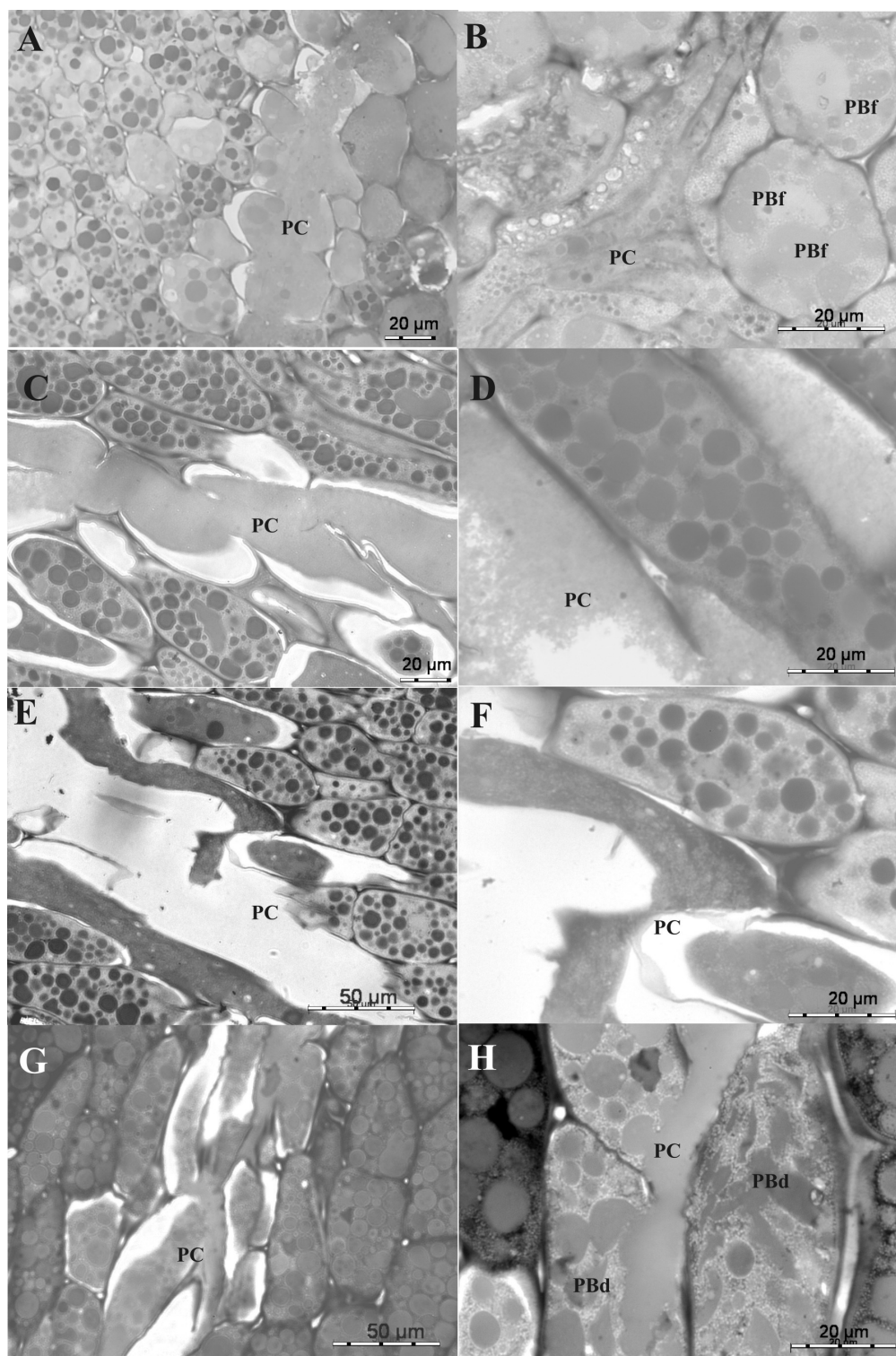


Figura 2.8. Tecido dos cotilédones de semente de soja madura danificado por percevejos pentatomídeos. *Dichelops melacanthus* (A, B); *Euschistus heros* (C, D); *Nezara viridula* (E, F); e *Piezodorus guildinii* (G, H). Canal formado pela perfuração dos estiletes (PC); fusão de corpos de proteína (PBf); dissolução de corpos de proteína (PBd).

A destruição das células dos cotilédones é ilustrada em detalhes na Fig. 2.9. A semente sem danos apresenta membrana plasmática coesa com a parede celular (CW), e corpo de proteína (PB), parede celular e esferossomos (vesículas de triglicerídeos) intactos (setas) (Fig. 2.9.A). Nas figuras restantes (sementes danificadas por percevejos) a membrana plasmática se afasta da CW e os corpos de proteína são mostrados em diferentes graus de destruição.

Nas sementes atacadas por *P. guildinii* (Figs. 2.9.E,F), os corpos de proteína estão completamente destruídos, sugerindo que a ação deletéria das enzimas salivares para os tecidos da semente é maior para esse percevejo em comparação com as outras espécies estudadas.

É possível que pectinases salivares sejam responsáveis pelo dano nos tecidos (Miles & Taylor 1994, Frati *et al.* 2006). As pectinases digerem a lamela média da parede celular das plantas (Batemann & Miller 1966), e causam o amolecimento e a morte das células próximas à região perfurada pelos estiletes (Hori 2000). Em análise preliminar, cisteína-proteases foram encontradas na saliva de *D. melacanthus* e *N. viridula* (Depieri & Panizzi 2008).

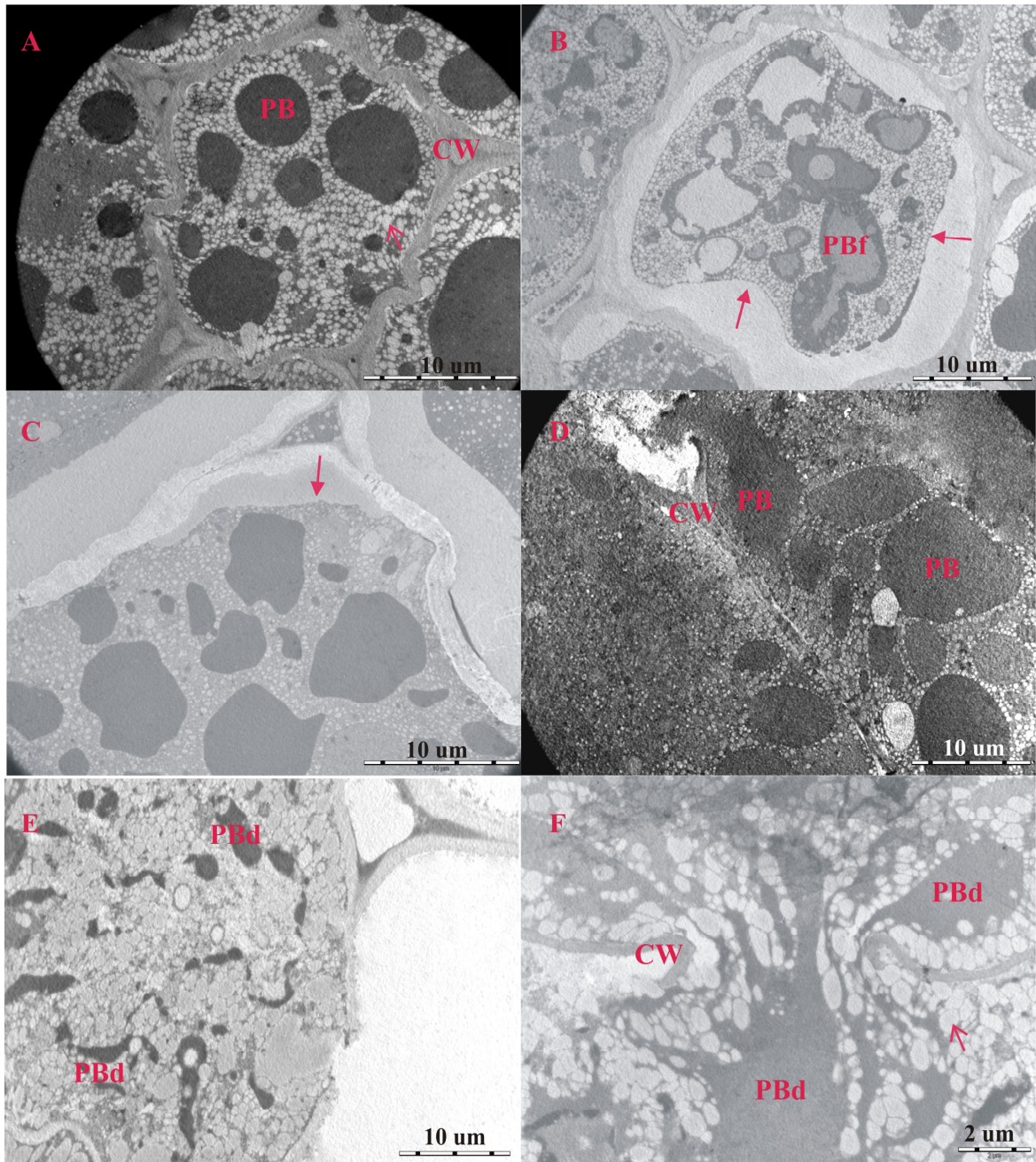


Figura 2.9. Células dos cotilédones de sementes de soja madura. Células de semente sem dano (A); células de semente danificada por *Dichelops melacanthus* (B); *Euschistus heros* (C); *Nezara viridula* (D); e *Piezodorus guildinii* (E, F). Parede celular (CW); corpo de proteína (PB); fusão de corpos de proteína (PBf); corpo de proteína dissolvido (PBd). Setas abertas indicam esferossomos; setas fechadas indicam retração da membrana celular.

P. guildinii causa maior dano à soja em comparação com outras espécies de pentatomídeos que atacam essa cultura (Sosa-Gomez & Moscardi 1995, Corrêa-Ferreira & Azevedo 2002). O dano causado por *P. guildinii* não tem relação com o comprimento dos estiletes, visto que a espécie tem aparelho bucal mais curto que *N. viridula* e *E. heros* (Panizzi & Machado-Neto 1992). Contudo, observa-se que *P. guildinii* introduz os estiletes mais profundamente nas sementes. Os resultados desse estudo indicam que o maior dano à soja se deva provavelmente, além da maior profundidade de inserção dos estiletes, aos componentes bioquímicos presentes na saliva de *P. guildinii* o que causa maiores danos às estruturas celulares das sementes em comparação com as outras três espécies de percevejos. Com exceção de *D. melacanthus*, o dano na semente foi diretamente proporcional ao tempo que os insetos se alimentavam.

2.4. Literatura citada

- Ávila, C. J. & A. R. Panizzi. 1995.** Occurrence and damage by *Dichelops* (*Neodichelops*) *melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) on corn. An. Soc. Entomol. Brasil 24: 193-194.
- Batemann, D. F. & R. L. Miller. 1966.** Pectic enzymes in tissue degradation. Annu. Rev. Phytopathol. 4: 119-146.
- Brier, H. 1993.** Extent of bug damage in soybeans dependent on species. Northern Focus 4-5.

- Chocorosqui, V. R. & A. R. Panizzi. 2004.** Impact of cultivation systems on *Dichelops melacanthus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) population and damage and its chemical control on wheat. *Neotrop. Entomol.* 33: 487-492.
- Chocorosqui, V. R. & A. R. Panizzi. 2008.** Nymph and adult biology of *Dichelops melacanthus* (Dallas) feeding on cultivated and non-cultivated host plants. *Neotrop. Entomol.* 37: 353-360.
- Cohen, A. C. 2000.** How carnivorous bugs feed. pp. 563-570 *In* Schaefer, C. W., & A. R. Panizzi (eds.). *Heteroptera of economic importance*. Boca Raton, CRC Press.
- Corrêa-Ferreira, B. S. & J. Azevedo. 2002.** Soybean seed damage by different species of stink bugs. *Agric. Forest Entomol.* 4: 145-150.
- Daugherty, D. M., Neustadt, M. H., Gehrke, C. W., Cavanah, L. E., Williams, L. F. & D. E. Green. 1964.** An evaluation of damage to soybeans by brown and green stink bugs. *J. Econ. Entomol.* 59: 719-722,
- Depieri, R. A. & A. R. Panizzi. 2008.** Análise preliminar de α -amilase, protease e endocelulase em saliva de percevejos pentatomídeos. *In* XXII Congresso Brasileiro de Entomologia. Uberlândia, Anais do XXII Congresso Brasileiro de Entomologia. CD-ROM.
- França-Neto, J. B., Krzyzanowski, F. C. & N. P. Costa. 1998.** O teste de tetrazólio em sementes de soja. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, Documentos 116.

- Fрати, F., Galletti, R., De Lorenzo, G., Salerno, G. & R. Conti. 2006.** Activity of endopolygalacturonases in mirid bugs (Heteroptera: Miridae) and their inhibition by plant cell wall proteins (PGIPs). *Eur. J. Entomol.* 103: 515-522.
- Hori, K. 2000.** Possible causes of disease symptoms resulting from the feeding of phytophagous Heteroptera. pp. 11-35 *In* Schaefer, C. W., and A. R. Panizzi (eds.). *Heteroptera of economic importance*. Boca Raton, CRC Press.
- Kogan, M. & S. G. Turnipseed. 1987.** Ecology and management of soybean arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 32: 507-538
- McPherson, R. M., Douce, G. K. & R. D. Hudson. 1993.** Annual variation in stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) seasonal abundance and species composition in Georgia soybean and its impact on yield and quality. *J. Entomol. Sci.* 28: 61-72.
- Miles, P. W. 1972.** The saliva of Hemiptera. *Adv. Insect Physiol.* 9: 183-255.
- Miles, P. W. 1987.** Plant sucking bugs can remove the content of cells without mechanical damage. *Experientia* 43: 937-939.
- Miles, P. W. & G. S. Taylor. 1994.** Osmotic pump feeding by coreids. *Entomol. Exp. Appl.* 73: 163-173.
- Miner, F. D. 1966.** Biology and control of stink bugs on soybeans. *Ark. Agric. Expt. Stn. Bull.* 708: 1-40.

- Nuorteva, P. & L. Reinius. 1953.** Incorporation and spread of C14-labeled oral secretions of wheat bugs in wheat kernels. *Ann. Entomol. Fenn.* 19: 95-104.
- Panizzi, A. R., Smith, J. G., Pereira, L. A. G. & J. Yamashita. 1979.** Efeitos dos danos de *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) no rendimento e qualidade da soja. *Anais I Semin. Nac. Pesq. Soja, Londrina, PR, Vol. II*, p. 59-78.
- Panizzi, A. R. & F. Slansky Jr. 1985.** Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. *Florida Entomol.* 68: 184-203.
- Panizzi, A. R. 1995.** Feeding frequency, duration and preference of the southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae) as affected by stage of development, age, and physiological condition. *An. Soc. Entomol. Brasil* 24: 437-444.
- Panizzi, A. R. & E. Machado-Neto. 1992.** Development of nymphs and feeding habits of nymphal and adult *Edessa meditabunda* (Heteroptera: Pentatomidae) on soybean and sunflower. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 85: 477-481.
- Panizzi, A. R., McPherson, J. E., James, D. G., Javahery, M. & R. M. McPherson. 2000.** Stink bugs (Pentatomidae). pp. 421-474 *In* Schaefer, C. W. and A. R. Panizzi (eds.). *Heteroptera of economic importance*. Boca Raton, CRC Press.

- Simmons, A. M. & K. V. Yeargan. 1988.** Feeding frequency and feeding duration of the green stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) on soybean. *Environ. Entomol.* 81: 812-815.
- SAS Institute Inc. 1998.** SAS user's guide: statistics. Version 6.12. Cary, SAS Institute.
- Sosa-Gomez, D. R., & F. Moscardi. 1995.** Retenção foliar diferencial em soja provocada por percevejos (Heteroptera: Pentatomidae). *An. Soc. Entomol. Brasil* 24: 401-404.
- Tillman, P. G. & B. G. Mullinix, Jr. 2004.** Comparison of susceptibility of pest *Euschistus servus* and predator *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae) to selected insecticides. *J. Econ. Entomol.* 97: 800-806.
- Todd, J. W. & S. G. Turnipseed. 1974.** Effects of southern green stink bug damage on yield and quality of soybeans. *J. Econ. Entomol.* 67: 421-426.
- Turnipseed, S. G. & M. Kogan. 1976.** Soybean entomology. *Annu. Rev. Entomol.* 21: 247-282.
- Vicentini, R. & H. A. Jimenez. 1977.** El vaneo de los frutos em soja. INTA Serie Técnica 47.

CAPÍTULO 3

Nova metodologia para o processamento do aparelho bucal de hemípteros (Heteroptera) para estudos microscópicos

Depieri R. A., Andrade C. G. T. J. & A. R. Panizzi. 2010. A new methodology for processing mouthparts of hemipterans (Hemiptera) for microscopic study. *Micron* 41: 169-171.

3.1. Introdução

A quitina é um polissacarídeo embebido em matriz proteica, e nas mandíbulas e maxilas dos insetos está normalmente associada com zinco e manganês, onde esses elementos contribuem com sua resistência (Schofield *et al.* 2002, Cribb *et al.* 2008). A resistência e impermeabilidade da quitina dificultam os estudos da morfologia interna de insetos adultos, especialmente do aparelho bucal. Os protocolos disponíveis fraturam a cutícula em pequenas partes, afetando a integridade do aparelho bucal (Beckel 1959, Haas 1992). Portanto, devido à resistência da quitina e da matriz proteica, que causa problemas durante seu processamento, seu amolecimento torna-se necessário.

Soluções de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) têm sido usadas para amolecer estruturas calcificadas, como ossos e dentes, para estudos microscópicos (Rode *et al.* 1996, Skinner 2003). O EDTA quelata cátions divalentes de íons metálicos, como o cálcio, manganês, ferro e zinco e este processo é acelerado por energia de micro-ondas (Rode *et al.* 1996, Hayat 2000). A aplicação de micro-ondas com o primer Z-6040 também pode ser útil para a preparação de amostras para microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão (Houck & Lindley 1993).

Nesse capítulo é descrita uma nova metodologia para amolecimento da cutícula para realização de estudos microscópicos do aparelho bucal de hemípteros, com preservação da estrutura dos estiletes e dos tecidos adjacentes.

3.2. Material e métodos

Percevejos adultos de *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) foram coletados em Londrina, norte do Paraná, usando uma rede entomológica em área de cultivo de soja, *Glycine max* (L.) Merr., durante o mês de outubro de 2008. As cabeças dos insetos foram retiradas com auxílio de microtesoura reta (FST - 15100-09, Heidelberg, Alemanha) e fixadas em solução de Bouin por 24 h, e lavadas com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2). Triplicatas das amostras fixadas foram imersas em solução aquosa de EDTA 7% (p/v) (Ethylenediamine Tetraacetic Acid – E6758 - Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, MO, EUA) em banho de gelo (Fig. 3.1) e irradiadas por energia de micro-ondas (2.450 MHz, 1,4 KW/h, Panasonic modelo Family, Panasonic Brasil, São Paulo, SP) durante 0,5, 1, 2, 3, 4 e 5 h. O banho de gelo foi trocado a cada três min para evitar o aquecimento das amostras.



Figura 3.1. Cuba de gelo contendo amostras de cabeças de *Nezara viridula* imersas em EDTA 7% para irradiação por micro-ondas.

Amostras testemunhas foram apenas fixadas em Bouin e outras fixadas e mantidas em EDTA em temperatura ambiente por 24 h. Em seguida, todas as amostras foram desidratadas em etanol em concentrações crescentes (70 a 100%), diafanizadas em xilol e embebidas em Paraplast® Plus (McCormick Scientific LLC, Saint Louis, MO, EUA). Foram feitas secções transversais (5 µm) do primeiro ao terceiro segmento do lábio usando micrótomo rotativo (Leica® RM 2265, Wetzlar, Alemanha) (Fig. 3.2.A,B). Essas secções foram coletadas em lâminas histológicas revestidas com gelatina, coradas em hematoxilina-eosina e tornadas permanentes com bálsamo do Canadá. As imagens das secções foram feitas usando microscópio Zeiss Axiophot® Imager (Jena, Alemanha) equipado com câmera Zeiss AxioCam® MRc5 (Munique, Alemanha).

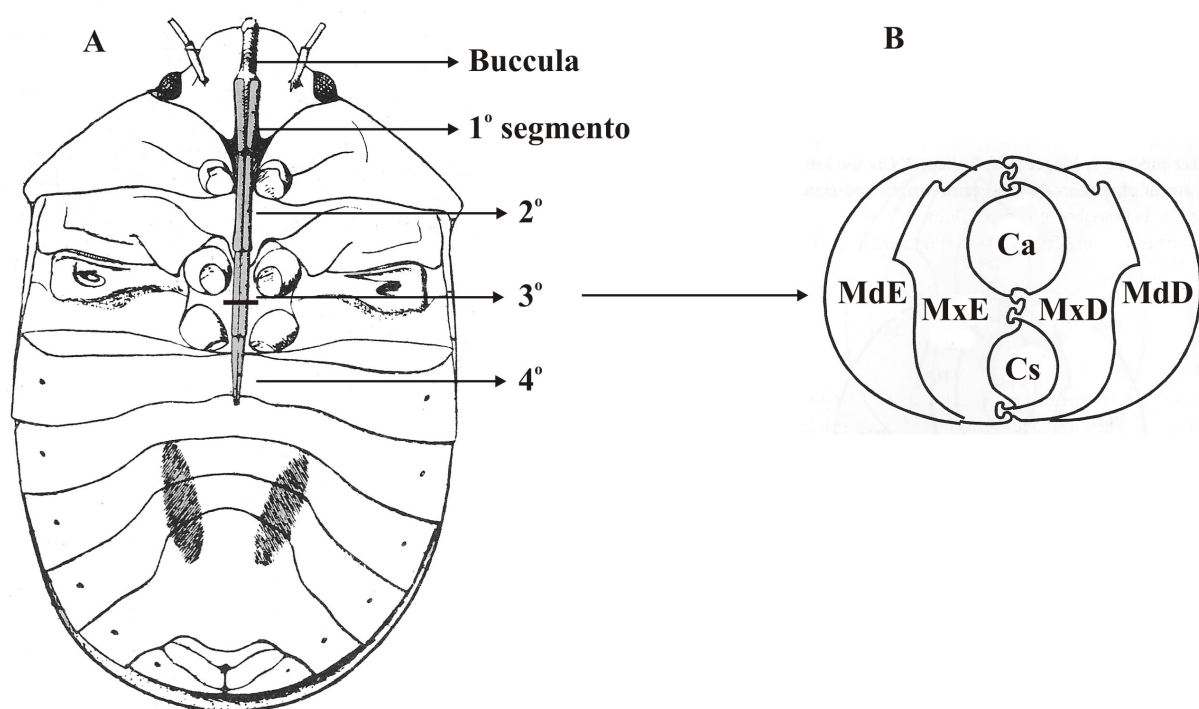


Figura 3.2. Diagrama geral da estrutura do aparelho bucal de um pentatomídeo (A), e secção transversal dos estiletes no 3º segmento do lábio (B). Ca = canal de alimento; Cs = canal de saliva; MdE = mandíbula esquerda; MdD = mandíbula direita; MxE = maxila esquerda; MxD

= maxila direita [A = baseado em Costa Lima (1940); B = baseado em Brozek & Herczek (2004)].

3.3. Resultados e discussão

As mandíbulas e maxilas do tratamento controle foram perdidas ou quebradas em pequenos fragmentos durante o processamento das amostras (Fig. 3.3.A), em função da dureza da cutícula sem tratamento. Amostras imersas em EDTA irradiadas em micro-ondas por 0,5 h tiveram a estrutura de cutícula e os tecidos adjacentes bem preservados e sem alterações morfológicas, sendo possível observar as junções entre as maxilas no terceiro segmento labial (Fig. 3.3.B). No segundo segmento, as mandíbulas e maxilas não se mantiveram íntegras com o mesmo tempo de tratamento. A mesma situação foi observada com 1 h de tratamento com EDTA e micro-ondas, e as mandíbulas e maxilas no segundo segmento foram arrastadas durante o processo de secção, sugerindo que essas estruturas não estavam moles o suficiente para serem cortadas no micrótomo. Após 2 h de tratamento as mandíbulas e maxilas foram parcialmente preservadas com algumas fissuras na matriz protéica, e com tecidos adjacentes danificados (Fig. 3.4.C). Tempos maiores de tratamento do aparelho bucal com EDTA e micro-ondas (até 5 h) causaram a quebra das mandíbulas e maxilas, resultando na perda de fragmentos durante a secção (Fig. 3.4.D).



Figura 3.3. Secções transversais do rosto de *Nezara viridula*. Primeiro segmento do lábio sem tratamento com EDTA e irradiação com micro-ondas, mostrando partes quebradas dos estiletes (mandíbulas e maxilas) (A); terceiro segmento do lábio tratado com EDTA 7% p/v por 0,5 h em micro-ondas, com estruturas de quitina e tecidos adjacentes preservados (B); segundo segmento do lábio tratado com EDTA por 2 h em micro-ondas, com estiletes e tecidos danificados (C); segundo segmento labial tratado por 5 h com EDTA em micro-ondas com estiletes fragmentados (D). Ca = canal de alimento; Cs = canal de saliva; MdE = mandíbula esquerda; MdD = mandíbula direita; MxE = maxila esquerda; MxD = maxila direita. Aumento $\approx 400\times$.

O uso do EDTA e irradiação por micro-ondas mostrou-se uma metodologia adequada para a preparação de amostras de cutícula esclerotizada para estudos morfológicos, como demonstrado aqui para o aparelho bucal de *N. viridula*. Entretanto, cada segmento do

um tempo de tratamento diferente para preservação da integridade das estruturas. Isto pode ser devido à variação da espessura do conjunto de estiletes e também porque algumas de suas regiões não são totalmente envolvidas pelos tecidos labiais (Cobben 1978).

Em conclusão, para estudos visando detalhar as áreas dos canais de alimento e de saliva, sugere-se o corte do rostro na altura do terceiro segmento labial tratado com EDTA e exposto por 0,5 h em micro-ondas.

3.4. Literatura citada

Beckel, W. E. 1959. Sectioning large heavily sclerotized whole insects. *Nature* 184: 1584-1585.

Brozek, J. & A. Herczek. 2004. Internal structure of the mouthparts of true bugs (Hemiptera: Heteroptera). *Polish J. Entomol.* 73: 70-106.

Cobben, R. H. 1978. Evolutionary trend in Heteroptera. Part II. Mouthpart-structures and feeding strategies. Wageningen, Mededelingen Landbouwhogeschool. 78-5.

Costa Lima, A. M. 1940. Insetos do Brasil. Escola Nacional de Agronomia, Rio de Janeiro, 2º Tomo.

Cribb, B. W., Stewart, A., Huang, H., Truss, R., Noller, B., Rasch, R. & M. P. Zalucki. 2008. Insect mandibles: comparative mechanical properties and links with metal incorporation. *Naturwissenschaften* 95: 17-23.

- Hayat, M. A. 2000.** Principles and techniques of electron microscopy. 4. ed. Cambridge, Cambridge University Press.
- Haas, F. 1992.** Serial sectioning of insects with hard exoskeleton by dissolution of the exocuticle. *Biotechn. Histochem.* 67: 50-54.
- Houck, M. A. & V. A. Lindley. 1993.** Microwave-primer technique for microscopic studies that involve arthropods. *Am. Entomol.* 38: 117-119.
- Rode, S. M., Faria, M. R. & M. P. Monteiro. 1996.** O uso de microondas para descalcificação de tecidos mineralizados da mandíbula de ratos. *Rev. Odontol. Univ. São Paulo* 10: 15-18.
- Schofield, R. M. S., Nesson, M. H. & K. A. Richardson. 2002.** Tooth hardness increases with zinc-content in mandibles of young adult leaf-cutter ants. *Naturwissenschaften* 89: 579-583.
- Skinner, R. A. 2003.** Decalcification of bone tissue. pp. 167-184 *In* An, Y. H. & K. L. Martin. Handbook of histology methods for bone and cartilage. Totowa, Humana Press.

CAPÍTULO 4

Comprimento do rostro, morfologia comparada da dentição mandibular e área dos canais de alimento e de saliva de percevejos pentatomídeos fitófagos (Heteroptera: Pentatomidae)

Depieri R. A. & A. R. Panizzi. Rostrum length and comparative morphology of mandible serration and of food and salivary canals of selected species of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae) *Arthropod Structure & Development* (submetido).

4.1. Introdução

O aparelho bucal dos percevejos (Heteroptera) apresenta mandíbulas e maxilas altamente modificadas (estiletos). O formato da ponta dos estiletos, dentição da ponta das mandíbulas, filtros com cerdas das maxilas, e o tamanho do canal de alimento em relação com os hábitos alimentares tem sido abordados (Faucheux 1975, Cobben 1978, Cohen 1990). Os estiletos mantêm-se unidos por junções do tipo canal-crista, que se estendem por quase todo o comprimento das maxilas (Cobben 1978, Cohen 2000).

Forbes (1976) observou a morfologia do aparelho bucal de *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) (Heteroptera: Lygaeidae) e concluiu que as maxilas eram ligeiramente mais longas que as mandíbulas. As pontas das mandíbulas apresentavam dentes em formato de anzol em suas superfícies externas. As superfícies externas das maxilas possuíam ganchos que se encaixavam em pequenas cavidades existentes nas superfícies internas das mandíbulas. Cobben (1978) analisou a largura e o comprimento dos estiletos, as junções que os unem, e o desenvolvimento do canal de saliva em vários grupos tróficos. Brozek & Herczek (2004) propuseram um modelo geral para as estruturas internas do aparelho bucal de Heteroptera,

avaliando o formato das junções entre as maxilas de insetos obtidos em museus entomológicos.

Os estudos do aparelho bucal realizados em insetos de idade desconhecida, obtidos de coleções entomológicas e de criações em laboratório (Cobben 1978, Rani & Madhavendra 1995, Brozek & Herczek 2004) podem possuir erros de interpretação, devido ao desgaste das mandíbulas durante o envelhecimento dos insetos (Roitberg *et al.* 2005, Depieri & Panizzi, submetido).

Nesse capítulo, comparamos o comprimento do rostro, a morfologia da ponta das mandíbulas, as áreas do canal de alimento e do canal de saliva e as junções entre as maxilas em percevejos pentatomídeos com idade conhecida, criados em laboratório.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Criação dos percevejos em laboratório

Adultos dos percevejos pentatomídeos *Dichelops melacanthus* (Dm) (Dallas), *Euschistus heros* (Eh) (F.), *Nezara viridula* (Nv) (L.), e *Piezodorus guildinii* (Pg) (West.) foram coletados em soja *Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae) cultivada na área experimental da Embrapa Soja em Londrina, PR (23° 11' S; 51° 11' O). Os insetos foram levados ao laboratório e separados em casais (n = 30) e acondicionados em caixas plásticas transparentes (25 x 20 x 20 cm) com fundo forrado com papel filtro, sendo alimentados com vagens verdes de feijão, *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae), sementes de soja e amendoim, *Arachis hypogaea* L. (Fabaceae) e frutos maduros de ligustro, *Ligustrum lucidum* Ait. (Oleaceae), e mantidos em câmara de criação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ U.R. e fotofase de 14 h, para promover a reprodução dos insetos e consequente uniformização da idade dos adultos utilizados nos experimentos.

4.2.2. Preparação das amostras para análises do rostro e da ponta das mandíbulas

Fêmeas adultas com menos de 1 dia ($n = 10$ para cada espécie) foram selecionadas e sacrificadas por congelamento, e tiveram o comprimento do rostro medido em estereomicroscópio Leica[®] MZ6 (Wetzlar, Alemanha) com ocular milimetrada. Suas mandíbulas (*D. melacanthus*, $n = 8$, *E. heros*, $n = 6$, *N. viridula*, $n = 8$, e *P. guildinii*, $n = 4$) foram fixadas por 12 h em solução de glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em tampão fosfato de sódio 0,2M (pH 7,2). Em seguida, as mandíbulas foram lavadas 3x com tampão fosfato, por um período total de 45 min para a remoção dos fixadores. Tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato foi usado para fazer a pós-fixação das amostras durante 1 h.

Após desidratação em série crescente de concentração de etanol, as mandíbulas foram coladas em "stubs" por meio de fita adesiva dupla face de carbono, e revestidas com ouro em metalizador (BAL-TEC[®] SCD050, Balzers, Liechtenstein) e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (FEI[®] Quanta 200, Eindhoven, Holanda).

O comprimento do ápice das mandíbulas foi determinado pela medida entre o início do primeiro dente e o fim do terceiro dente lateral (Fig. 4.1 - linha a). A largura do ápice das mandíbulas foi determinada pela medida obtida entre a porção média dos terceiros dentes laterais (Fig. 4.1 - linha b).



Figura 4.1. Ponta da mandíbula de *Dichelops melacanthus*; comprimento do ápice da mandíbula (a); largura entre a porção média dos terceiros dentes laterais da mandíbula (b); 1, 2, 3 e 4 = dentes centrais; 1', 2' e 3' = dentes laterais. Microscopia eletrônica de varredura, aumento 1.200x.

4.2.3. Área da secção transversal do canal de alimento e do canal de saliva, e junções dos estiletos maxilares

Devido às irregularidades estruturais nos ápices dos estiletos, apenas secções proximais do feixe de estiletos podem ser comparadas (Cobben 1978). O terceiro segmento do rostro é normalmente bem desenvolvido e sua secção transversal permite melhores análises das conexões internas entre os elementos do aparelho bucal, das posições do canal de alimento, do canal de saliva e das mandíbulas (Brozek & Herczek 2004). É essencial que a comparação dos mesmos elementos estruturais seja feita no mesmo ponto de secção transversal (Forbes 1976).

Fêmeas adultas com menos de 1 dia de emergência foram dissecadas e as cabeças com o aparelho bucal (*D. melacanthus*, n = 20; *E. heros*, n = 20; *N. viridula*, n = 21; e *P.*

guildinii, n = 18) tiveram a cutícula amolecida pela metodologia de Depieri *et al.* (2010), e fixadas por 12 h com glutaraldeído 3%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,2M (pH 7,2). As amostras foram lavadas 3x com tampão cacodilato de sódio (0,1M) por um período total de 45 min para remover resíduos dos fixadores. A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio. As cabeças dos insetos foram desidratadas com etanol em concentrações crescentes, diafanizadas com óxido de propileno (1,2-epoxi propano) e gradualmente infiltradas durante cinco dias com misturas de resina Araldite 502[®] (Hatfield, PA, EUA) e óxido de propileno. Em seguida as cabeças dos insetos foram transferidas para moldes de silicone e mantidas a 60°C por 24 h para polimerização dos blocos de resina.

Os blocos contendo a cabeça e aparelho bucal de cada espécie de pentatomídeo foram aparados para a retirada de rebarbas de resina e preparação da superfície de corte. Cortes semi-finos transversais (2 µm) foram realizados no terceiro segmento do rostro com navalha de vidro (45°) em ultramicrotomo Leica[®] Ultracut UCT (Wetzlar, Alemanha). As secções foram coradas com azul de toluidina em lâminas histológicas e tornadas permanentes com Entellan[®] (Hatfield, PA, EUA). As secções foram observadas e fotografadas em microscópio Zeiss Axio[®] Imager A1. As áreas transversais do canal de alimento e do canal de saliva foram medidas com o programa Zeiss AxioVision[®] (Munique, Alemanha). As áreas medidas foram usadas para calcular a razão canal alimentar/canal salivar (Ca/Cs), para comparar o tamanho relativo dos canais entre as diferentes espécies.

O terceiro segmento do rostro foi seccionado transversalmente (70 nm) com navalha de diamante de 45° (Diatome[®] ultra 45°, Diatome AG, Biel, Suíça) em ultramicrotomo Leica[®] Ultracut UCT, e colocado em telas de cobre com 200 *mesh*, para observação e obtenção de imagens das junções das maxilas, em microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai[®] T12

(Eidhoven, Holanda) sob voltagem de 80 Kv. A descrição das estruturas internas do aparelho bucal foi baseada em Brozek & Herczek (2004) (Fig. 4.2).

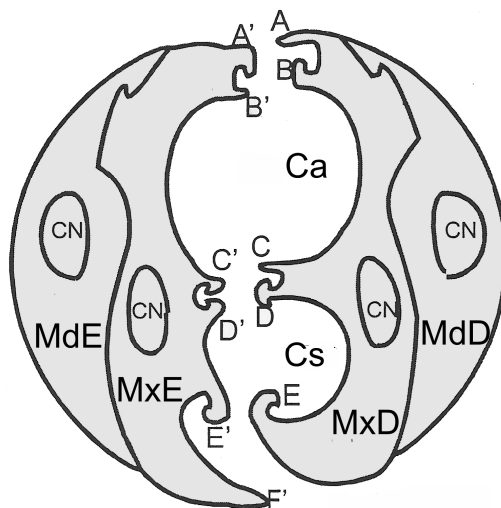


Figura 4.2. Diagrama geral da secção transversal dos estiletes na altura do terceiro segmento do lábio de Heteroptera; maxilas com três junções. Ca = canal de alimento, Cs = canal de saliva, MxD = maxila direita, MxE = maxila esquerda, MdD = mandíbula direita, MdE = mandíbula esquerda, CN = canal neural, A = processo superior reto direito da junção dorsal, A' = processo superior "em gancho" esquerdo da junção dorsal, B = processo inferior "em gancho" direito da junção dorsal, B' = processo inferior "em gancho" esquerdo da junção dorsal, C = processo superior reto direito da junção média, C' = processo superior "em gancho" esquerdo da junção média, D = processo superior "em T" direito da junção média, D' = processo inferior "em gancho" esquerdo da junção média, E = processo direito da junção ventral, E' = processo superior esquerdo da junção ventral, F' = processo inferior esquerdo da junção ventral. Baseado em Brozek & Herczek (2004).

4.2.4. Delineamento experimental e análise estatística

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado em todos os experimentos. Os dados foram submetidos para o teste de análise de variância e as médias comparadas usando o teste de Tukey ($P \leq 0,05$) (SAS Institute Inc. 1998).

4.3. Resultados e discussão

4.3.1 Comprimento do rostro e morfologia da ponta da mandíbula

O comprimento do rostro foi variável entre as diferentes espécies de pentatomídeos analisados, com *N. viridula* (Nv) mostrando o maior comprimento (5,9 mm) e *P. guildinii* (Pg) o menor comprimento (3,5 mm); em *D. melacanthus* (Dm) (4,9 mm) e *E. heros* (Eh) (5,1 mm) esse valor foi intermediário e similar (Tabela 4.1). Panizzi & Machado-Neto (1992) registraram valores mais altos que os relatados aqui para o comprimento do rostro de fêmeas de Nv, Eh, e Pg, coletados na mesma área do Brasil. Para o percevejo cosmopolita Nv, Follett *et al.* (2009) encontraram valor médio do comprimento do rostro de 6,5 mm (faixa de 5,4 - 7,5 mm) em adultos (provavelmente machos e fêmeas) coletados no campo no Hawaii. Embora não foram feitas medidas do comprimento do corpo das fêmeas, os espécimes de laboratório de Nv examinados eram possivelmente menores que os utilizados nos dois trabalhos referidos acima, pois nesses foram utilizados insetos obtidos na natureza, e normalmente espécimes de laboratório são menores que espécimes coletados no campo (A. R. Panizzi, não publicado).

Os valores de comprimento e largura da ponta das mandíbulas foram também maiores em *N. viridula* e menores em *P. guildinii* (Tabela 4.1). *E. heros* mostrou comprimento da ponta da mandíbula maior que *D. melacanthus*, mas as larguras das pontas das mandíbulas foram similares. Todas as espécies mostraram um padrão similar de dentição na ponta das mandíbulas, com número fixo de dentes centrais e pares de dentes laterais (Figs.

4.1 e 4.3). Cohen (1990) observou variações de 16 a 17 dentes mandibulares em reduvídeos a poucos dentes em pentatomídeos e ligueídeos. A ponta das mandíbulas em Dm e em Pg foram similares no formato da borda e na ausência de estruturas com textura escamosa observada em Eh e Nv (Fig. 4.3. A-D). A superfície interna da mandíbula das quatro espécies apresentam textura escamosa, formando uma canaleta que acomoda a maxila longitudinalmente. Cobben (1978) afirmou que a orientação desse pavimento interno da mandíbula fricciona a superfície externa da maxila durante o processo de alimentação, contribuindo com o encurvamento da ponta da mandíbula.

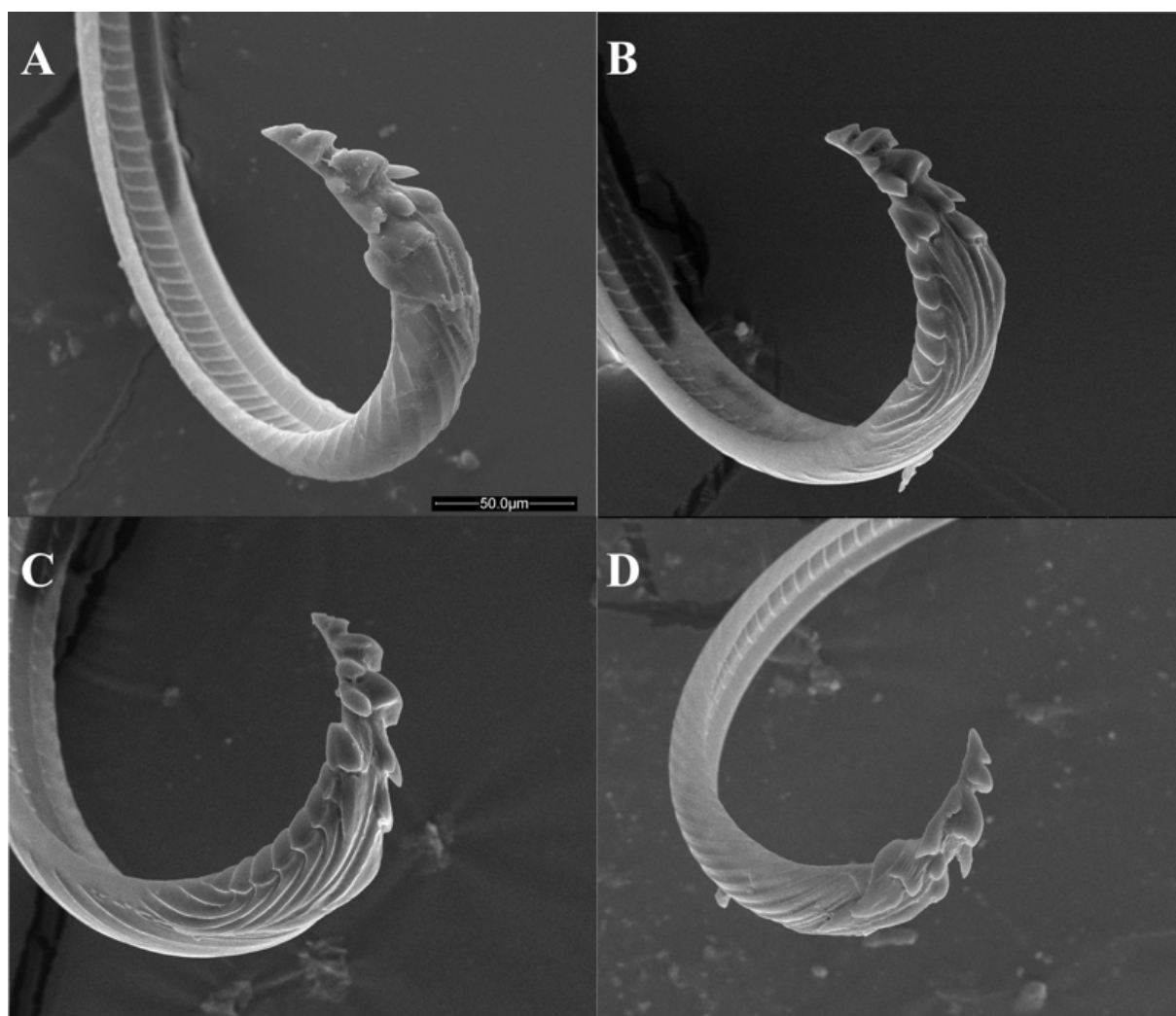


Figura 4.3. Ponta dos estiletos mandibulares de pentatomídeos fitófagos; *Dichelops melacanthus* (A); *Euschistus heros* (B); *Nezara viridula* (C); *Piezodorus guildinii* (D). Microscopia eletrônica de varredura, aumento 600x.

Tabela 4.1. Médias (\pm E.P.) do comprimento do rostro, do comprimento da ponta e da largura das mandíbulas e número de dentes de pentatomídeos fêmeas adultas tenerais (< 1 dia) (número de observações em parênteses). Dados originais em Anexo 2.1.

Espécies	Comprimento do rostro (mm)	Comprimento da ponta da mandíbula (μ m) ¹	Largura da ponta da mandíbula (μ m) ¹	Número de dentes centrais	Número de pares de dentes laterais
<i>Dichelops melacanthus</i>	4,9 \pm 0,029 b (10)	81,0 \pm 0,75 c (8)	26,8 \pm 0,35 b (8)	4	3
<i>Euschistus heros</i>	5,1 \pm 0,030 b (10)	87,9 \pm 0,89 b (6)	27,0 \pm 0,36 b (6)	4	3
<i>Nezara viridula</i>	5,9 \pm 0,046 a (10)	106,0 \pm 1,11 a (4)	30,2 \pm 0,50 a (4)	4	3
<i>Piezodorus guildinii</i>	3,5 \pm 0,094 c (10)	71,1 \pm 1,08 d (4)	23,7 \pm 0,43 c (4)	4	3

¹Médias em cada coluna seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

4.3.2. Áreas da secção transversal do canal de alimento e do canal de saliva e junções dos estiletes maxilares

As áreas da secção transversal do canal de alimento (Ca) e do canal de saliva (Cs) no terceiro segmento do rostro foram maiores em *N. viridula* e *D. melacanthus* em comparação com *E. heros* e *P. guildinii* (Tabela 4.2). Essa última espécie apresentou os canais menos

calibrosos. Entretanto, quando se considera a razão Ca/Cs, Pg apresentou valor relativo mais alto, possuindo área do canal de alimento relativamente maior do que as outras espécies estudadas. Pg é conhecida por ser a espécie de pentatomídeo mais prejudicial às sementes de soja. (Sosa-Gomez & Moscardi 1995, Corrêa-Ferreira & Azevedo 2002), mas a razão disso ainda é desconhecida. Recentemente, Depieri & Panizzi (submetido) demonstraram que a maior área da semente destruída, em comparação com outros pentatomídeos, se deve a maior ação da saliva nos tecidos da semente.

Tabela 4.2. Médias (\pm E.P.) da área do canal de alimento e do canal de saliva, e razão dos canais (Ca/Cs) no terceiro segmento do rostro de pentatomídeos fêmeas adultas tenerais (< 1 dia) (número de observações em parênteses). Dados originais em Anexo 2.1.

Espécies	Área do canal de alimento	Área do canal de saliva	Ca/Cs ¹
	($\mu\text{m}^2 \pm \text{E.P.}$) ¹	($\mu\text{m}^2 \pm \text{E.P.}$) ¹	
<i>Dichelops melacanthus</i>	144,1 \pm 4,72 a (20)	98,3 \pm 3,39 ab (20)	1,48 \pm 0,05 ab (20)
<i>Euschistus heros</i>	120,8 \pm 2,81 b (20)	87,6 \pm 2,79 b (20)	1,39 \pm 0,03 b (20)
<i>Nezara viridula</i>	159,6 \pm 5,10 a (21)	104,1 \pm 3,55 a (21)	1,55 \pm 0,5 ab (21)
<i>Piezodorus guildinii</i>	95,8 \pm 3,43 c (17)	62,5 \pm 1,82 c (17)	1,59 \pm 0,07 a (17)

¹Médias em cada coluna seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

As junções que unem os estiletos maxilares estão ilustradas em detalhes na Fig. 4.4. A maxila direita apresenta cinco processos e a maxila esquerda seis processos. Um processo superior curto e reto, e um processo inferior mais longo "em T" formam a junção dorsal da maxila direita. Na maxila esquerda, ambos processos da junção dorsal são similares ("em gancho") (Fig. 4.4. - a1, b1, c1, d1). A junção média possui um mecanismo similar, mas com o processo superior da maxila esquerda "em T", e o processo superior da maxila direita é reto (Fig. 4.4. - a2, b2, c2, d2). A junção ventral consiste por um processo "em T" na maxila direita, um processo "em gancho" superior, e um processo reto inferior na maxila esquerda. Brozek & Herczek (2004) descrevem padrão similar no mecanismo de junção das maxilas de *Pentatomorpha*.

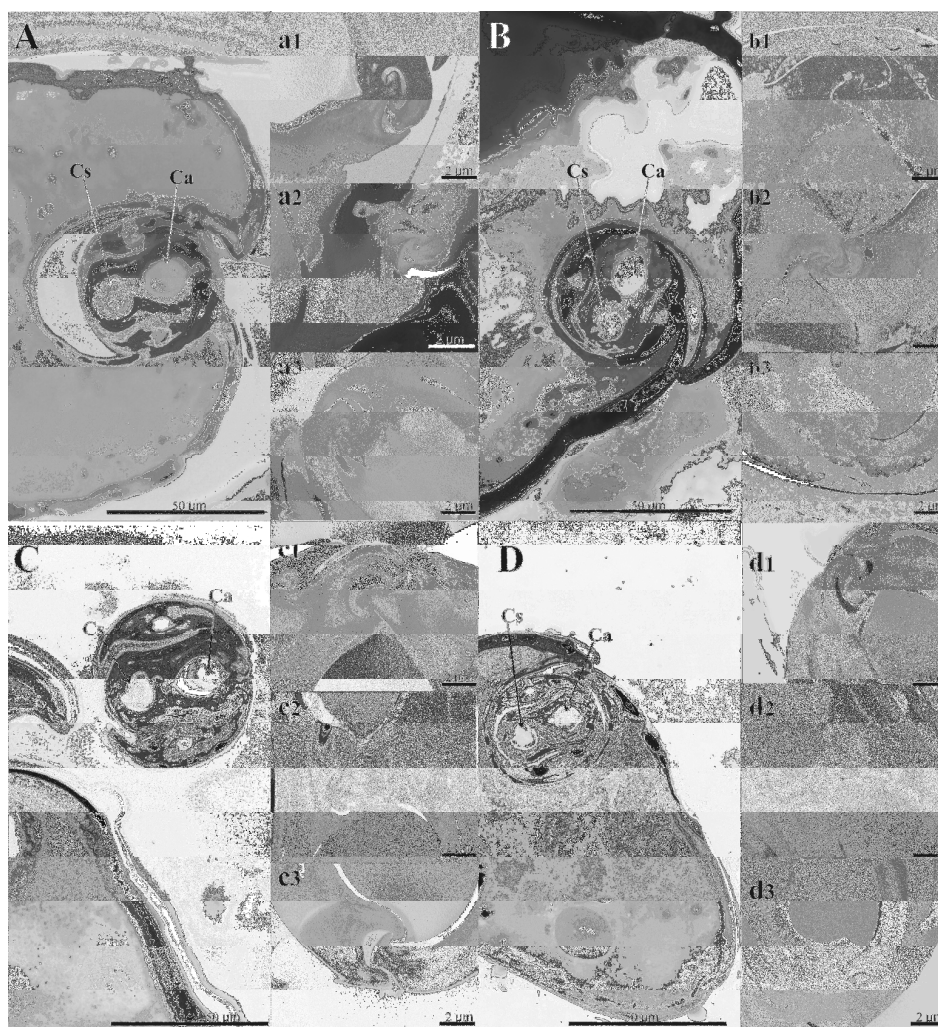


Figura 4.4. Secção transversal do terceiro segmento do rostro. *Dichelops melacanthus* (A); *Euschistus heros* (B); *Nezara viridula* (C); e *Piezodorus guildinii* (D). Canal de alimento e canal de saliva (Ca, Cs) e detalhes das três junções que unem as maxilas; a1, a2, a3 = junção dorsal, média e ventral em *D. melacanthus*; b1, b2, b3 = junção dorsal, média e ventral em *E. heros*; c1, c2, c3 = junção dorsal, média e ventral em *N. viridula*; e d1, d2, d3 = junção dorsal, média e ventral em *P. guildinii*. A, B, C, D = microscopia óptica, aumento de 600x; a1 - a3; b1 - b3; c1 - c3; e d1 - d3 = microscopia eletrônica de transmissão, aumento de 5.800x.

Estes resultados indicam que esses pentatomídeos pragas possuem comprimento variável de rostro e morfologia variável interespecífica na dentição da mandíbula e no canal

de alimento e no canal de saliva. Essas características podem auxiliar no melhor entendimento da extensão dos danos que eles causam às sementes de sua planta hospedeira em comum, a soja. Considerando que a razão Ca/Cs foi maior em *P. guildinii*, o que indica que possui canal de alimento relativamente maior, isto pode contribuir na maior área de dano que essa espécie provoca nas sementes de soja, em comparação com as outras espécies de pentatomídeos.

4.4. Literatura citada

- Brozek, J. & A. Herczek. 2004.** Internal structure of the mouthparts of true bugs (Hemiptera: Heteroptera). Polish J. Entomol. 73: 70-106.
- Cobben, R. H. 1978.** Evolutionary trends in Heteroptera. Part II. Mouthpart-structures and feeding strategies. Wageningen, Mededelingen Landbouwhogeschool. 78-5.
- Cohen, A. C. 1990.** Feeding adaptations of some predaceous Hemiptera. Ann. Entomol. Soc. Am. 83: 1215-1223.
- Cohen, A. C. 2000.** How carnivorous bugs feed. pp. 563-570 *In* Schaefer, C. W. & A. R. Panizzi (eds.). Heteroptera of economic importance. Boca Raton, CRC Press.
- Corrêa-Ferreira, B. S. & J. Azevedo. 2002.** Soybean seed damage by different species of stink bugs. Agric. Forest. Entomol. 4: 145-150.

- Depieri R. A., Andrade C. G. T. J. & A. R. Panizzi. 2010.** A new methodology for processing mouthparts of hemipterans (Hemiptera) for microscopic study. *Micron* 41: 169-171.
- Depieri R. A., & A. R. Panizzi.** Aging and food source effects on mandibular teeth wear of phytophagous stink bug (Heteroptera: Pentatomidae). (Submetido).
- Depieri R. A. & A. R. Panizzi.** Duration of feeding and superficial and in-depth damage to soybean seed by selected species of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). (Submetido).
- Faucheux, M. M. 1975.** Relations entre l'ultrastructure des stylets mandibulaires et maxillaires et la prise de nourriture chez les Insectes Hemipteres. *C. R. Acad. Sci. Paris (Ser. D)* 281: 41-44.
- Follett, P. A., Wright, M. G. & M. Golden. 2009.** *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) feeding patterns in macadamia nuts in Hawaii: nut maturity and cultivar effects. *Environ. Entomol.* 38: 1168-1173.
- Forbes, A. R. 1976.** The stylets of the large milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae) and their innervation. *J. Entomol. Soc. Brit. Columbia* 73: 29-32.
- Panizzi, A. R. & E. Machado-Neto. 1992.** Development of nymphs and feeding habits of nymphal and adult *Edessa meditabunda* (Heteroptera: Pentatomidae) on soybean and sunflower. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 85: 477-481.

- Rani, P. U. & S. S. Madhavendra. 1995.** Morphology and distribution of antennal sense organs and diversity of mouthparts structures in *Odontopus nigricornis* (Stall) and *Nezara viridula* L. (Hemiptera). Int. J. Insect. Morphol. Embryol. 24: 119-132.
- Roitberg, B. D., Gillespie, D. R., Quiring, D. M. J., Alma, C. R., Jenner, W. H., Perry, J., Peterson, J. H., Salomon, M. & S. VanLaerhoven. 2005.** The cost of being an omnivore: mandible wear from plant feeding in a true bug. Naturwissenschaften 92: 431-434.
- SAS Institute Inc. 1998.** SAS user's guide: statistics. Version 6.12. Cary, SAS Institute.
- Sosa-Gomez, D. R. & F. Moscardi. 1995.** Retenção foliar diferencial em soja provocada por percevejos (Heteroptera: Pentatomidae). An. Soc. Entomol. Brasil 24: 401-404.

CAPÍTULO 5

Efeitos do envelhecimento e do tipo de alimento no desgaste da dentição mandibular do pentatomídeo fitófago *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera)

Depieri R. A. & A. R. Panizzi. Aging and food source effects on mandibular stylets teeth wear of phytophagous stink bug (Heteroptera: Pentatomidae). Neotropical Entomology (submetido).

5.1. Introdução

A alimentação com tecidos vegetais frequentemente resulta em desgaste dos componentes do aparelho bucal dos insetos, especialmente das mandíbulas (Chapman 1995). Apesar de sua estrutura ser altamente esclerotizada, e que pode ser reforçada com a presença de íons de zinco ou magnésio na quitina (Schofield *et al.* 2002), esse fenômeno pode ocorrer.

Graus variáveis de desgaste das mandíbulas foram registrados em muitos grupos de insetos com aparelho bucal mastigador, como em gafanhotos (Chapman 1964, Gangwere 1965, Gangwere *et al.* 1976, Kaufmann 1971), lagartas (Djamin & Pathak 1967) e besouros (fitófagos e carnívoros) (Raupp 1985, Wallin 1988). Mesmo insetos que se alimentam em alimentos "macios" como hifas de fungos apresentam desgaste dos dentes mandibulares (Welton 1988). O desgaste das mandíbulas e outras estruturas do aparelho bucal são comuns em insetos aquáticos que se alimentam de algas (Arens 1990) e isso provavelmente é um fenômeno generalizado em insetos mandibulados de vida longa.

Em relação aos insetos com aparelho bucal picador-sugador, pouco se conhece sobre o efeito do alimento e do envelhecimento no desgaste dos estiletes mandibulares. Roitberg *et al.* (2005) avaliaram o desgaste das mandíbulas do percevejo zoofitófago *Dicyphus hesperus*

Knight (Heteroptera: Miridae), comparando adultos tenerais com insetos adultos velhos. Eles relataram que a alimentação em tecidos vegetais aumenta o desgaste dos estiletes mandibulares em relação à zoofagia.

Até o momento, exceto o estudo reportado por Roitberg *et al.* (2005), nenhum outro estudo foi realizado para medir o desgaste das mandíbulas de percevejos fitófagos. Para avaliar isso, selecionaram-se fêmeas do pentatomídeo *Euschistus heros* (F.) que foram alimentadas com diferentes tipos de alimentos. Também comparou-se o desgaste a partir de adultos jovens (< 1 dia) com insetos adultos mais velhos para demonstrar o efeito do envelhecimento no desgaste das mandíbulas.

5.2. Material e métodos

5.2.1. Criação dos percevejos em laboratório

Adultos dos percevejos *E. heros* foram coletados em soja *Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae) cultivada na área experimental da Embrapa Soja em Londrina, PR (23° 11' S; 51° 11' O) durante o mês de outubro de 2008. Os insetos foram levados ao laboratório e separados em casais (n = 30), acondicionados em caixas plásticas transparentes (25 x 20 x 20 cm) com fundo forrado com papel filtro, e alimentados com vagem verde de feijão, *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae), sementes de soja e amendoim, *Arachis hypogaea* L. (Fabaceae) e frutos maduros de ligustro, *Ligustrum lucidum* Ait. (Oleaceae). Os insetos foram mantidos em câmara de criação a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ U.R. e fotofase de 14 h durante a realização dos estudos. O alimento foi trocado a cada dois dias, e as ninfas obtidas foram criadas até à emergência dos adultos.

5.2.2. Preparação das amostras e medições realizadas

Fêmeas adultas de *E. heros* com menos de um dia de emergência (tenerais) foram selecionadas da colônia estabelecida em laboratório e alimentadas com dieta natural (dieta composta pelas estruturas vegetais referidas acima) por 30 (n = 5) e 60 dias (n = 5), e com dieta artificial (dieta seca - um *pellet* quadrado com 0,5 cm/inseto - Panizzi *et al.* 2000) por 60 dias (n=4). Os alimentos foram trocados a cada dois dias e os percevejos mantidos sob as mesmas condições abióticas da câmara de criação. Esses insetos foram comparados com fêmeas com menos de um dia de idade para avaliar o desgaste da dentição mandibular.

As mandíbulas foram retiradas do aparelho bucal com auxílio de alfinetes entomológicos (n° 00) e fixadas por 12 h em mistura de glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em tampão fosfato de sódio 0,2M (pH 7,2). Em seguida, as mandíbulas foram lavadas 3x com tampão fosfato, por um período total de 45 min para a remoção dos fixadores. Tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato foi usado para fazer a pós-fixação das amostras durante 1 h.

Após a desidratação em série crescente de concentração de etanol, as mandíbulas foram coladas em "stubs" por meio de fita adesiva dupla face de carbono, revestidas com ouro em metalizador (BAL-TEC® SCD050, Balzers, Liechtenstein) e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (FEI® Quanta 200, Eindhoven, Holanda).

O desgaste dos dentes das mandíbulas foi determinado pela medida do comprimento total da região da mandíbula que contém os dentes (μm) (Fig. 5.1.a), comprimento do dente distal (1° dente) (μm) (Fig. 5.1.b) e altura do 2° dente (μm) (Fig. 5.1.c). A medida da dimensão "a" foi realizada por abranger a estrutura mais importante para cortar a fonte de alimento; as dimensões "b" e "c" foram medidas porque o desgaste do dente distal pode ser

mais evidente em seu comprimento e o desgaste do 2º dente pode ser mais pronunciado em sua altura, respectivamente.

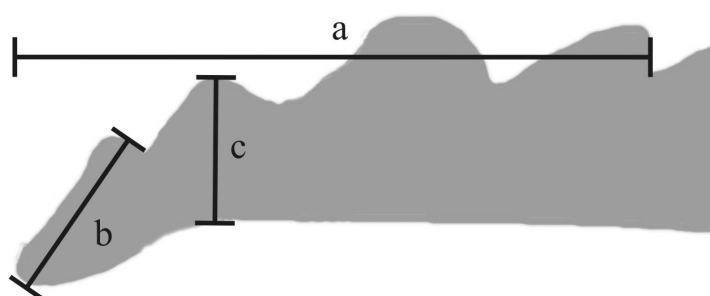


Figura 5.1. Diagrama da vista lateral da ponta da mandíbula de *Euschistus heros*. Comprimento total da área com dentes (a); Comprimento do dente distal (1º dente) (b); Altura do 2º dente (c).

5.2.3. Resistência do alimento à penetração

Foi utilizado um penetrômetro de bancada (Marconi® MA933, 0,25 mm/s, pino de 3 mm de diâmetro com ponta fina - Marconi Equipamentos para Laboratório Ltda, Piracicaba, SP) para determinar a força necessária para a penetração em diferentes componentes da dieta natural, e em pellet de dieta artificial. O tempo médio penetração usado foi de 8 s para sementes de soja (n = 22), 12 s para sementes de amendoim (n = 22), 14 s para vagens de feijão (n = 22) e para dieta artificial (n = 35). Os resultados da força necessária para penetrar as dietas foram expressos em Newtons e calculados pela multiplicação da unidade registrada pelo equipamento (kg/f) por 9,806 (g).

5.2.4. Delineamento experimental e análise estatística

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado em todos os experimentos. As médias das diferentes medidas da ponta da mandíbula, e as médias da força necessária para penetrar os diferentes alimentos foram submetidas à análise de variância (ANOVA), e comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) (SAS Institute 1981, Zar 1984).

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Desgaste mandibular em adultos de *Euschistus heros*

O desgaste mandibular de fêmeas adultas de *E. heros* variou com a idade do inseto e com o tipo de dieta consumida (Tabela 5.1). O comprimento total da região da mandíbula que contém os dentes foi significativamente maior nos insetos tenerais ($P \leq 0,05$) que nos insetos alimentados por 60 dias em dieta natural e em dieta artificial. Adultos com 30 dias de idade apresentaram valores intermediários, demonstrando a tendência ao desgaste da região que contém os dentes em comparação com o comprimento dessa região nos insetos tenerais. Embora a diferença no desgaste não tenha sido sempre significativa, houve tendência de redução maior do comprimento da ponta da mandíbula nos insetos alimentados em dieta natural (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Desgaste mandibular em fêmeas adultas de *Euschistus heros* de diferentes idades alimentadas em dieta natural e em dieta artificial (número de indivíduos examinados em parênteses). Ver Fig. 5.1. para detalhes ilustrando como foram realizadas as medidas dos itens abaixo. Dados originais em Anexo 3.1.

Idade do adulto (Alimento)	Comprimento total da região que contém dentes mandibulares (μm) ¹ (X \pm E.P.)	Comprimento do dente distal (1º dente) (μm) ¹ (X \pm E.P.)	Altura do 2º dente (μm) ¹ (X \pm E.P.)
< 1 dia	57,9 \pm 2,52 a (5)	14,1 \pm 0,29 a (5)	14,2 \pm 0,52 a (5)
30 dias (dieta natural)	52,2 \pm 1,63 ab (5)	11,7 \pm 0,29 b (5)	11,1 \pm 0,34 b (5)
60 dias (dieta natural)	45,0 \pm 1,84 b (5)	9,9 \pm 0,23 c (5)	9,7 \pm 0,62 b (4)
60 dias (dieta artificial)	50,0 \pm 1,11 b (4)	13,4 \pm 0,37 a (4)	11,0 \pm 0,42 b (4)

¹Médias nas colunas seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

O comprimento do dente distal (1º dente) seguiu padrão similar. Adultos tenerais (Fig. 5.2.A) mostraram comprimento do dente distal significativamente maior do que o observado nos adultos alimentados em dieta natural por 30 (Fig. 5.2.B) e por 60 dias (Fig.

5.2.C). Os insetos alimentados durante 60 dias em dieta artificial não tiveram desgaste significativo do dente distal (Fig. 5.2.D). Em relação a altura do 2º dente, adultos tenerais apresentaram o maior valor, enquanto os insetos alimentados em dieta natural (por 30 ou 60 dias) ou em dieta artificial apresentaram valores menores e similares (Tabela 5.1).

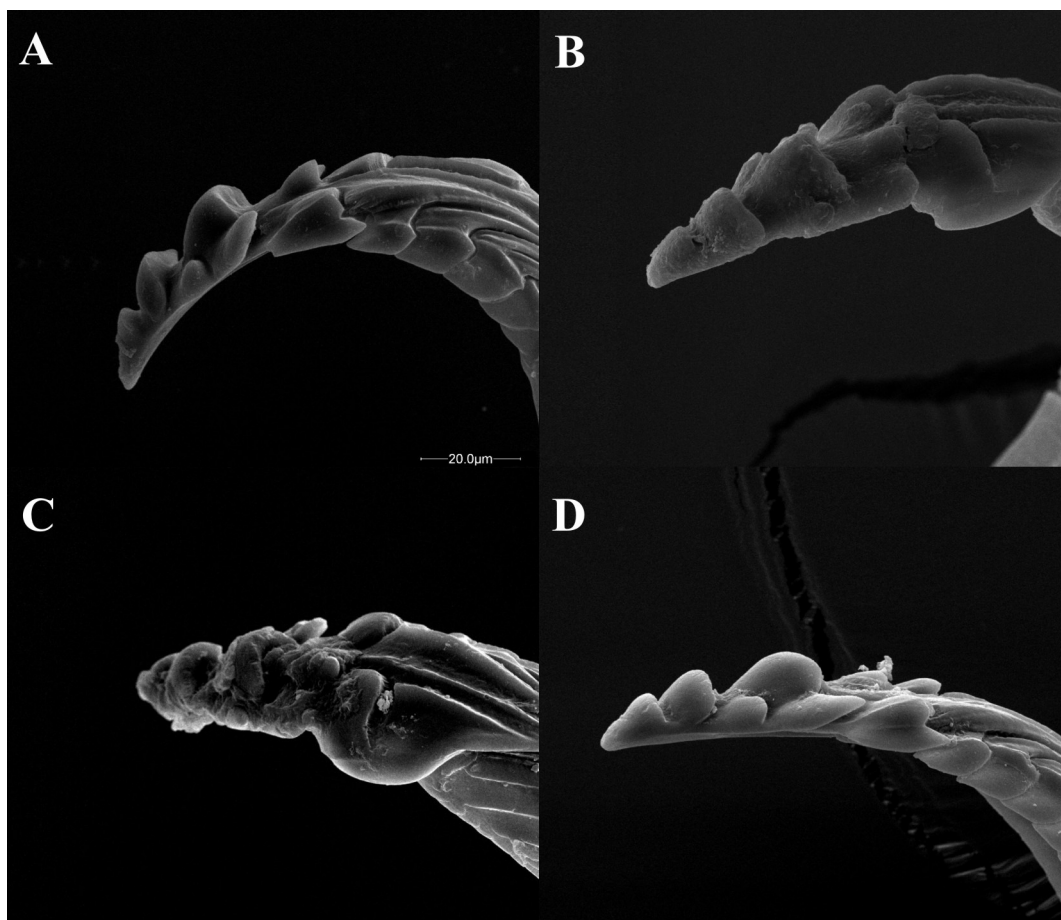


Fig. 5.2. Ponta da mandíbula de fêmea adulta de *Euschistus heros*. Adulto teneral (< 1 dia) (A); adulto com 30 dias alimentado com dieta natural (B); adulto com 60 dias alimentado com dieta natural (C); adulto com 60 dias alimentado com dieta artificial (D). Microscopia eletrônica de varredura, aumento de 1.200x.

Estes resultados demonstram o desgaste da ponta do estilete mandibular de *E. heros* devido ao envelhecimento e alimentação em dietas diferentes. Roitberg *et al.* (2005)

estudando o mirídeo zoofitófago *D. hesperus* observaram que as fêmeas mais velhas tiveram maior desgaste na dentição mandibular que as fêmeas jovens. Também relataram que o desgaste dos estiletes mandibulares foi maior em insetos alimentados com estruturas vegetais do que em insetos que só tiveram acesso à água. Este desgaste provavelmente foi causado pela resistência dos tecidos à penetração do estilete.

5.3.2. Resistência do alimento à penetração

Os resultados da medida da força necessária para penetrar as dietas natural e artificial são apresentados na Tabela 5.2. Os dados demonstram que o alimento natural fresco e após três dias de exposição aos percevejos foram mais resistentes à penetração que a dieta artificial.

A relação entre a força necessária para penetrar os diferentes alimentos e o comprimento da ponta da mandíbula é ilustrada na Fig. 5.3. Os alimentos naturais mostraram resistência variável à penetração, com valores mais elevados em semente fresca de soja madura (SSMF) e semente fresca de amendoim (RSPF). Após três dias de exposição aos insetos, suas resistências à penetração diminuíram e foram similares às necessárias para penetrar a vagem verde fresca de feijão (GBPF) e vagem verde de feijão após três dias de uso (GBP3), na medida que ficaram mais macias por absorver umidade. Estes alimentos naturais usados por *E. heros* por 30 dias (EH30) ou 60 dias (EH60) causaram a diminuição do comprimento total da ponta da mandíbula. Um valor intermediário de comprimento da ponta da mandíbula foi observado em insetos que se alimentaram em dieta artificial (EHAD). A força necessária para penetrar a dieta artificial (ADDF) foi a menor entre os alimentos testados. Os insetos adultos tenerais (EHAT) que não se alimentaram mostraram as pontas das mandíbulas com o maior comprimento.

Tabela 5.2. Valores médios (\pm E.P.) da força necessária para penetrar dietas natural e artificial oferecidas para fêmeas adultas de *Euschistus heros* em laboratório (número de amostras testadas entre parênteses). Dados originais em Anexo 3.2.

Dietas	Força para penetrar (Newtons) ¹
Semente de soja (fresca)	59,4 \pm 1,73 a (22)
Semente de amendoim (fresca)	24,5 \pm 0,61 b (22)
Semente de amendoim (após três dias de exposição)	11,2 \pm 0,51 c (22)
Vagem verde de feijão (após três dias de exposição)	9,3 \pm 0,57 cd (22)
Vagem verde de feijão (fresca)	9,2 \pm 0,38 cd (22)
Semente de soja (após três dias de exposição)	8,5 \pm 0,40 d (22)
Dieta artificial	6,1 \pm 0,18 e (35)

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey($P \leq 0,05$). Dados transformados por \sqrt{x} para análise de variância (ANOVA) e comparação das médias.

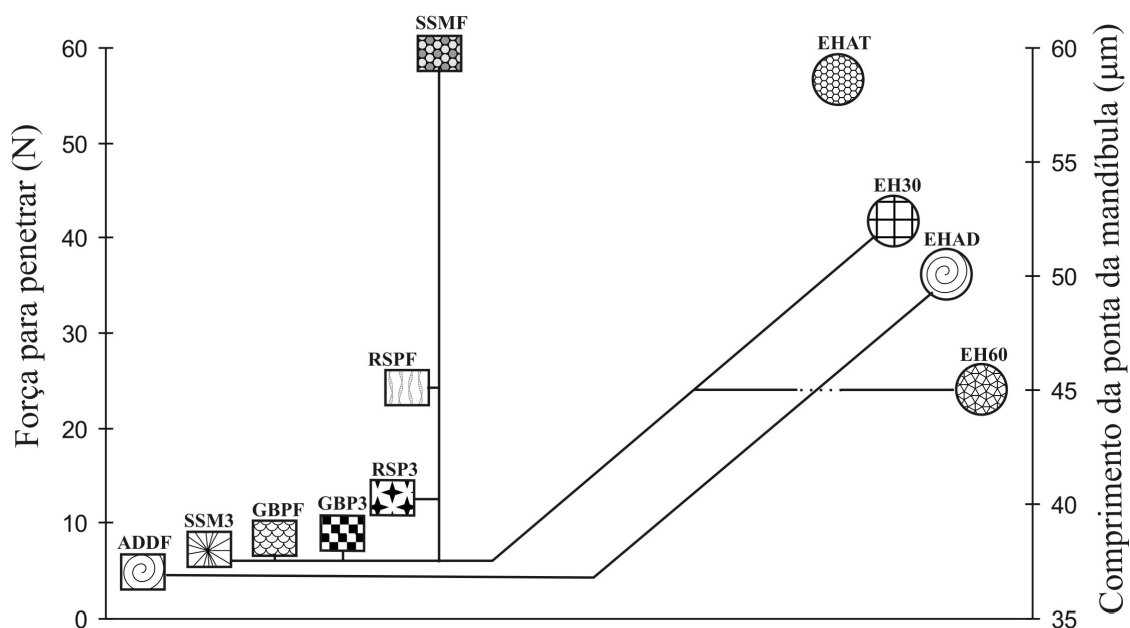


Figura 5.3. Relação entre a força necessária para penetrar dietas natural e artificial usadas para alimentar fêmeas adultas de *Euschistus heros* em laboratório e o comprimento total da ponta da mandíbula. ADDF = dieta artificial; SSM3 = semente de soja após três dias de exposição; GBPF = vagem verde fresca de feijão; GBP3 = vagem verde de feijão após três dias de exposição; RSP3 = semente de amendoim após três dias de exposição; RSPF = semente de amendoim fresca; SSMF = semente de soja fresca; EHAT = Adulto teneral de *E. heros*; EH30 = *E. heros* alimentado por 30 dias com dieta natural; EHAT = *E. heros* alimentado por 60 dias em dieta artificial; e EH60 = *E. heros* alimentado por 60 dias em dieta natural.

A dentição mandibular em Heteroptera foi discutida e ilustrada em vários trabalhos (Faucheux 1975, Cobben 1978, Cohen 1990, 1996) mas, com exceção do relato de Roitberg *et al.* (2005), nenhuma informação foi encontrada na literatura em relação ao efeito do envelhecimento e do tipo de alimento no desgaste da dentição da mandíbula. Aparentemente, o desgaste da mandíbula não impede que o inseto se alimente, mas esse fenômeno pode ter influência na frequência alimentar de insetos velhos. Entretanto, esse aspecto é especulativo, e

estudos adicionais devem ser conduzidos para demonstrar se o desgaste da dentição mandibular pode ter algum efeito negativo na alimentação do inseto.

5.4. Literatura citada

Arens, W. 1990. Wear and tear of mouthparts: a critical problem in stream animals feeding on epilithic algae. *Can. J. Zool.* 68: 1896-1914.

Chapman, R. F. 1964. The structure and wear of mandibles in some African grasshoppers. *Proc. Zool. Soc. London* 143: 305-320.

Chapman, R. F. 1995. Mechanics of food handling by chewing insects. pp. 3-31 *In* Chapman, R. F. & G. Boer (eds.). *Regulatory mechanisms in insect feeding*. New York, Chapman & Hall.

Cobben, R. H. 1978. Evolutionary trend in Heteroptera. Part II. Mouthpart-structures and feeding strategies. Wageningen, Mededelingen Landbouwhogeschool. 78-5.

Cohen, A. C. 1990. Feeding adaptations of some predaceous Hemiptera. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 83: 1215-1223.

Cohen, A. C. 1996. Plant feeding by predatory Heteroptera: evolutionary and adaptational aspects of trophic switching. pp. 1-17 *In* Alomar, O. & R. N. Wiedenmann (eds.). *Zoophytophagous Heteroptera: implications for life history and integrated pest management*. Lanham, Proc. Thomas Say Publications in Entomology.

- Djamin, A. & M. D. Pathak. 1967.** Role of silica in resistance to Asian rice borer, *Chilo suppressallis* (Walker), in rice varieties. J. Econ. Entomol. 60: 347-351.
- Faucheux, M. M. 1975.** Relations entre l'ultrastructure des stylets mandibulaires et maxillaires et la prise de nourriture chez les Insectes Hemipteres. C. R. Acad. Sci. Paris (Ser. D) 281: 41-44.
- Follett, P. A., Wright, M. G. & M. Golden. 2009.** *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) feeding patterns in macadamia nut in Hawaii: nut maturity and cultivar effects. Environ. Entomol. 38: 1168-1173.
- Gangwere, S. K. 1965.** Food selection in the oedipodine grasshopper *Arphia sulphurea* (Fabricius). Am. Midl. Nat. 74: 67-75.
- Gangwere, S. K., Evans, F. F. & M. L. Nelson. 1976.** The food-habits and biology of Acrididae in an old-field community in southeastern Michigan. Great Lakes Entomol. 9: 83-123.
- Kaufmann, T. 1971.** Biology and ecology of *Melanoplus borealis* (Orthoptera: Acrididae) in Fairbanks, Alaska with special reference to feeding habits. Michigan Entomol. 4: 3-13.
- Panizzi, A. R., Parra, J. R. P., Santos, C. H. & D. R. Carvalho. 2000.** Rearing the Southern green stink bug using an artificial dry diet and an artificial plant. Pesq. Agropec. Bras. 35: 1709-1715.

- Raupp, M. J. 1985.** Effects of leaf toughness on mandibular wear of the leaf beetle, *Plagiodera versicolora*. Ecol. Entomol. 10: 73-79.
- Roitberg, B. D., Gillespie, D. R., Quiring, D. M. J., Alma, C. R., Jenner, W. H., Perry, J., Peterson, J. H., Salomon, M. & S. VanLaerhoven. 2005.** The cost of being an omnivore: mandible wear from plant feeding in a true bug. Naturwissenschaften 92: 431-434.
- SAS Institute. 1981.** SAS for linear models. A guide to the ANOVA and GLM procedures. Cary, SAS Institute.
- Schofield, R. M. S., Nesson, M. H. & K. A. Richardson. 2002.** Tooth hardness increases with zinc-content in mandibles of young adult leaf-cutter ants. Naturwissenschaften 89: 579-583.
- Wallin, H. 1988.** Mandible wear in the carabid beetle *Pterostichus melanarius* in relation to diet and burrowing behaviour. Entomol. Exp. Appl. 48: 43-50.
- Welton, M. N. 1988.** A morphometric analysis of mandibular teeth in *Falsomia* (Collembola: Isotomidae). Zool. J. Linn. Soc. 94: 99-109.
- Zar, J. H. 1984.** Biostatistical analysis. 2. ed. Englewood Cliffs, Prentice-Hall.

CAPÍTULO 6

Análise preliminar de α -amilase, protease e endocelulase em saliva de percevejos pentatomídeos (Heteroptera)

Depieri R. A. & A. R. Panizzi. 2008. Análise preliminar de alfa-amilase, protease e endocelulase em saliva de percevejos pentatomídeos. In XXII Congresso Brasileiro de Entomologia, 2008, Uberlândia. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Entomologia. CD-ROM.

6.1. Introdução

Os tipos de enzimas digestivas, especialmente aquelas de origem salivar, são altamente correlacionados com os hábitos alimentares dos hemípteros (Goodchild 1966, Miles 1972, Cohen 1990). Nuorteva (1958) relatou a presença de proteases e amilases na saliva de espécies que se alimentam no mesófilo, e ausência dessas enzimas na saliva de insetos que se alimentam em tecidos vasculares. Miles (1972) e Cohen (1990) discutiram a presença de proteases e fosfolipases em insetos predadores. Triacilglicerol lipases também foram relatadas em extratos de glândulas salivares de insetos predadores (Cohen 1990). Entretanto, proteases e lipases salivares não estão presentes apenas em heterópteros predadores. Percevejos sugadores de sementes, como *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) (Heteroptera: Lygaeidae) e *Dysdercus fasciatus* Signoret (Heteroptera: Pyrrhocoridae) possuem proteases e lipases digestivas (Feir & Beck 1961, Khan & Ford 1967).

A α -amilase é uma enzima encontrada nas glândulas salivares de muitos heterópteros fitófagos, tendo sido identificada em Pentatomidae (18 espécies), Coreidae (9), Lygaeidae (10), Dinidoridae (1), Pyrrhocoridae (4), Miridae (25), Acanthosomatidae (4), Aradidae (1),

Cydnidae (1), Largidae (1), Scutelleridae (1), Berytidae (1) e Tingidae (1) (detalhes em Hori 2000). Todavia, alguns desses resultados podem ter sido obtidos por meio de metodologias questionáveis. Testes de identificação da α -amilase, baseados na reação amido-iodo sem a presença de um agente oxidante como o peróxido de hidrogênio não fornecem resultados confiáveis (Taylor & Miles 1994). Erros na avaliação da presença de α -amilase também podem ocorrer em estudos com a utilização da glândula salivar, devido à contaminação de seus extratos com hemolinfa (Hori 2000). Portanto, alguns dos resultados relatados acima talvez deveriam ser confirmados.

Entre as enzimas que hidrolisam proteínas, as cisteína-proteases (Catepsina L) tem papel fundamental para os artrópodes. Em insetos podem ser digestivas (Terra & Ferreira 1994, 2005), envolvidas na degradação de vitelo (Cho *et al.* 1999) ou na metamorfose (Takahashi *et al.* 1993). A ocorrência da Catepsina L digestiva, no lugar das serino-proteases, nos hemípteros e nos coleópteros (série Cucujiformia) talvez seja a principal adaptação bioquímica que permitiu que esses insetos se alimentassem de sementes ricas em inibidores de serino-proteases (Terra & Ferreira 1994, Terra & Cristofolletti 1996, Cristofolletti *et al.* 2003). A Catepsina L foi isolada do intestino médio de *Dysdercus peruvianus* Guérin-Ménéville (Heteroptera: Pyrrhocoridae) (Bifano 2008), contudo pouco se conhece sobre sua presença na saliva de percevejos pentatomídeos.

A endocelulase carboximetil-celulase inicia a digestão da celulose presente nas paredes celulares das células vegetais, quebrando as ligações internas (não-covalentes) da estrutura cristalina da celulose e expondo suas cadeias polissacarídicas (Fig. 6.1). Geralmente, é produzida em conjunto com outras celulasas por bactérias no intestino médio dos insetos, não existindo relatos sobre sua presença em secreções salivares (Nation 2002).

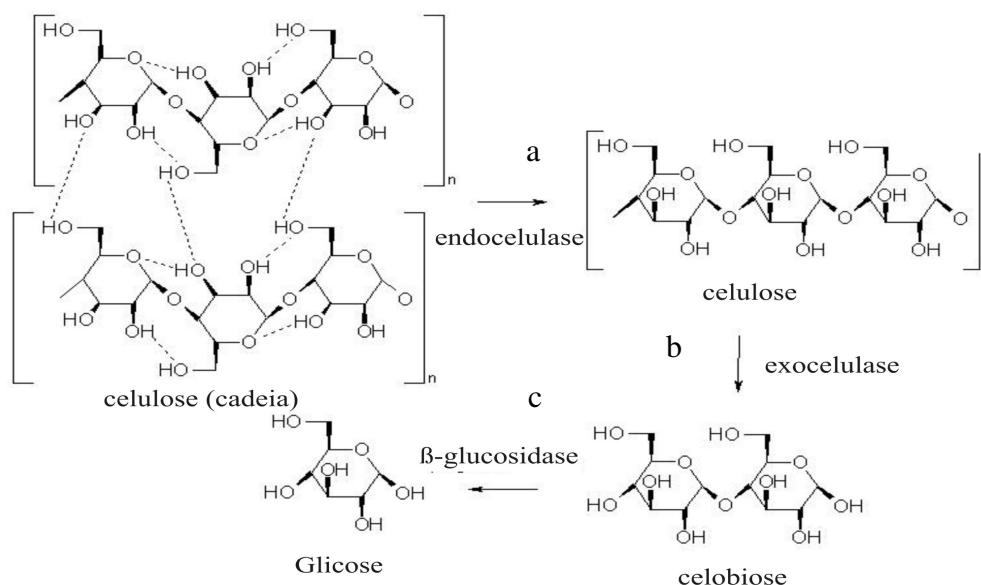


Figura 6.1. Mecanismo da digestão da celulose. Quebra das ligações não-covalentes presentes na estrutura cristalina da celulose pela endocelulase (a); hidrólise da cadeia polissacarídica em dissacarídeos pela exocelulase (b); hidrólise dos dissacarídeos em glicose pela β -glucosidase (c) (baseado em Nation 2002).

Neste capítulo avaliou-se a presença de α -amilase, cisteína protease (Catepsina L) e endocelulase (carboximetil-celulase) na saliva de percevejos adultos alimentados e em jejum das espécies *Dichelops melacanthus* (Dallas), *Euschistus heros* (F.) e *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae).

6.2. Material e métodos

6.2.1. Coleta de saliva

A saliva dos percevejos adultos *D. melacanthus*, *E. heros* e *N. viridula* alimentados com vagem verde de feijão, *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae), sementes de soja *Glycine max* (L.) Merr. (Fabaceae), e amendoim, *Arachis hypogaea* L. (Fabaceae), e frutos maduros de

ligustro, *Ligustrum lucidum* Ait. (Oleaceae), e em jejum (24 h) foi coletada manualmente com capilar graduado (Fig. 6.2). Os insetos foram seguros manualmente com a parte ventral exposta e os estiletes inseridos no capilar para induzir a salivação. Utilizou-se 10 µl de saliva de cada espécie por ensaio.



Figura 6.2. Coleta de saliva do percevejo pentatomídeo *Euschistus heros* com capilar graduado.

6.2.2. Ensaios para α -amilase

Para avaliar a presença da α -amilase salivar se usou como substrato 0,1 g amido solúvel dissolvido em 10 ml de tampão fosfato (pH 7,0) contendo 12 mg de cloreto de sódio.

A saliva dos insetos alimentados foi diluída 20x e 200x, e a dos insetos em jejum diluída 20x em solução de amido em tubos de ensaio, sendo mantidos a 30°C em banho-maria. A atividade da α -amilase salivar dos insetos alimentados foi interrompida em intervalos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 min), e nos insetos em jejum em intervalos de 60

minutos (60, 120, 180 e 240 min) e, em seguida, os tubos foram fervidos para desnaturação da enzima.

Para quantificar o poder redutor da enzima, 250 µL de ácido dinitrosalicílico foram adicionados nas amostras e, em seguida, a solução foi fervida por 5 min. Após o resfriamento das amostras em temperatura ambiente, fez-se a leitura de absorbância (550 nm) no espectrofotômetro (Noelting & Bernfeld 1948).

6.2.3. Análise de protease (cisteína-proteases – Catepsina L)

Para avaliar a presença da enzima Catepsina L usou-se substrato fluorogênico ZFRMCA 1 mM (Z-Phe-Arg 7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride, C9521 - Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, MO, EUA), diluído 100x em tampão Tris-HCl (0,1M, pH 8,5) (Erlanger *et al.* 1961), com substituição de substrato cromogênico por substrato fluorogênico.

A saliva dos insetos alimentados foi diluída em 10x, 20x, 100x e 500x no substrato. Nos insetos em jejum, a saliva foi diluída em 10x (*D. melananthus*) e em 5x (*E. heros* e *N. viridula*). A atividade da cisteína-protease salivar dos insetos alimentados foi interrompida com 250 µL de ácido acético 30% em intervalos de 30 minutos (30, 60, 90 e 120 min), e nos insetos em jejum, em intervalos de 60 minutos (60, 120, 180 e 240 min) e, em seguida, as amostras foram submetidas à análise em fluorímetro de microplacas, com excitação a 380 nm e emissão a 460 nm (Alves *et al.* 1996).

6.2.4. Ensaios para carboximetil-celulase

Para avaliar a presença da enzima carboximetil-celulase na saliva de *D. melananthus*, *E. heros* e *N. viridula* usou-se substrato carboximetil-celulose 1% (4-Methylumbelliferyl β-D-

cellobioside, M6018 - Sigma-Aldrich, Inc.) em tampão citrato-fosfato pH 6,0 (Noelting & Bernfeld 1948), com substituição do substrato original e do tampão.

A saliva dos insetos em jejum (24 h) foi diluída 7x no substrato. A atividade da enzima celulolítica foi avaliada em cinco tempos (0, 240, 1260 e 1500 min), nos quais as amostras foram fervidas para inativação da enzima.

Para quantificar a digestão do substrato, 250 µL de ácido dinitrosalicílico foram adicionados nas amostras e, em seguida, a solução foi fervida por 5 min. Após o resfriamento das amostras em temperatura ambiente, fez-se a leitura de absorbância (550 nm) em espectrofotômetro.

6.3. Resultados e discussão

Os resultados indicaram que não houve atividade de α -amilase na saliva de indivíduos alimentados de *D. melacanthus* e *E. heros* (Fig. 6.3.A-D). A atividade da enzima na saliva de *N. viridula* foi inconclusiva, pois não houve aumento gradual de quebra da cadeia do amido (Fig. 6.3.E-F).

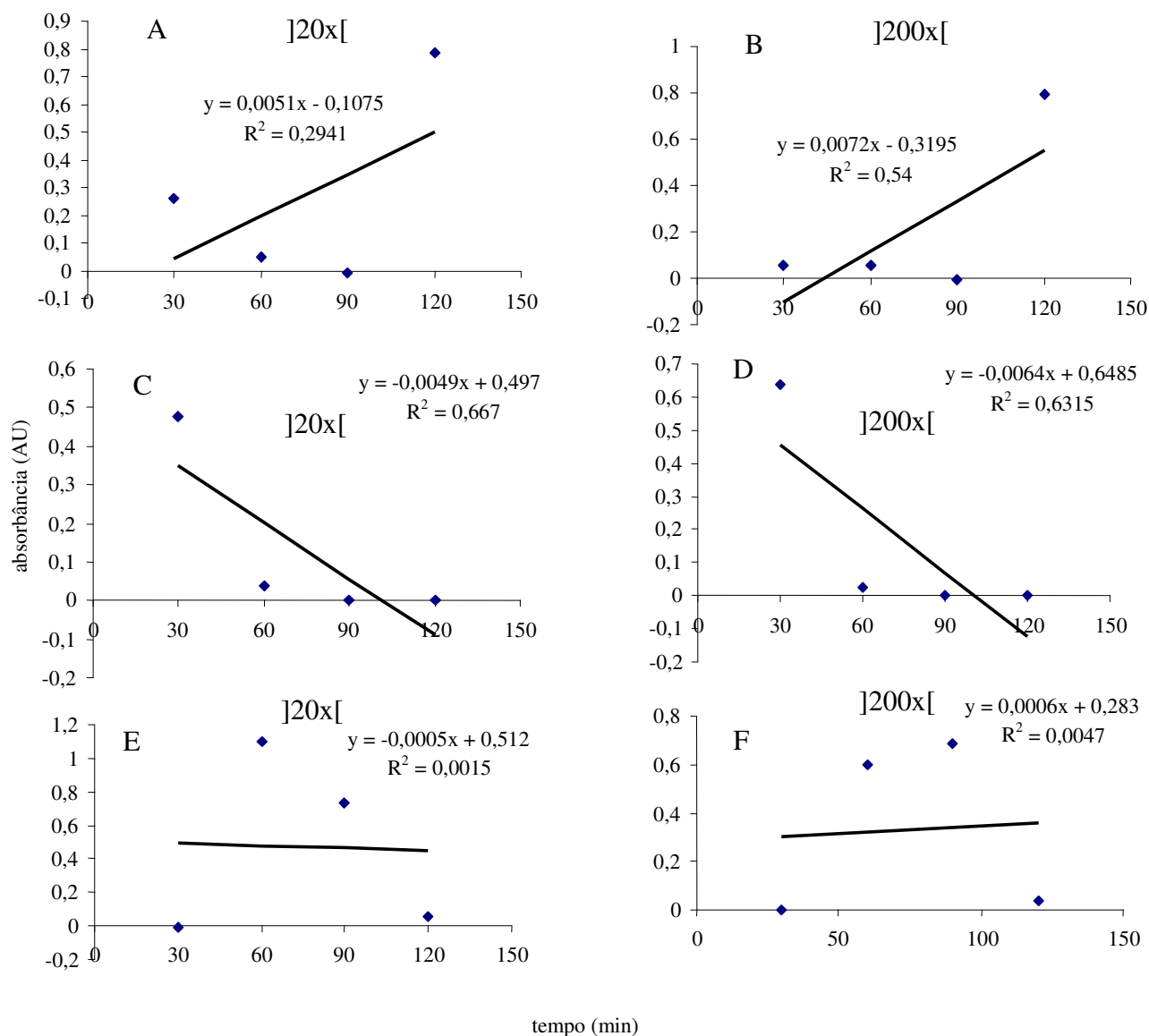


Figura 6.3. Atividade de α -amilase da saliva de *Dichelops melacanthus* (A, B), *Euschistus heros* (C, D) e *Nezara viridula* (E, F). Insetos alimentados, diluição da saliva em solução de amido em colchetes abertos.

Quando os percevejos foram mantidos em jejum, a saliva das três espécies não demonstrou possuir atividade de α -amilase (Fig. 6.4.A-C).

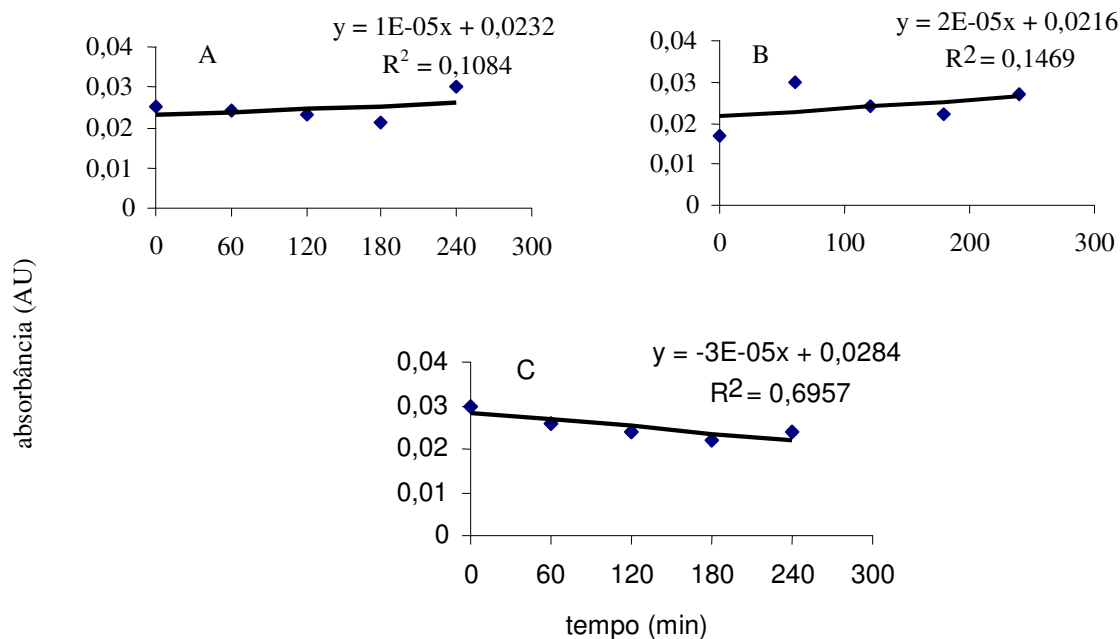


Figura 6.4. Atividade de α -amilase da saliva de *Dichelops melacanthus* (A), *Euschistus heros* (B) e *Nezara viridula* (C). Insetos em jejum por 24 h. Saliva diluída 20x em solução de amido.

A α -amilase foi relatada na saliva de alguns heterópteros: *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) (Lygaeidae) (Miles 1967), *Lygus rugulipennis* Poppius, (= *L. disponis*) *L. pratensis* (L.), *L. gemellatus* (Herrich-Schaeffer) (Hori 1971, Varis *et al.* 1983). A enzima também pode ser encontrada nos extratos de glândulas salivares de *Aelia acuminata* L. (Pentatomidae) (Nuorteva 1954), praga ocasional de trigo (Grünbacker & Kromp 2008), e *Nezara antennata* Scott (Pentatomidae), espécie polífaga relatada como praga em arroz (Hori 1972, Kisimoto 1983). Sementes de leguminosas, de importantes plantas hospedeiras de *D. melacanthus*, *E. heros* e *N. viridula*, e em especial de soja, apresentam quantidades reduzidas de amido (0,2% a 0,9%) (Wilson *et al.* 1978). Assim, é possível que as três espécies de pentatomídeos

estudadas não produzam α -amilase, ou o volume secretado na saliva esteja abaixo do nível de detecção pelo protocolo utilizado.

A saliva de *D. melacanthus* diluída 10x e 20x apresentou atividade de cisteína-proteases (Catepsina L) (Fig. 6.5.AB). Nas diluições mais elevadas (100x e 500x) (Fig. 6.5.CD) e nos insetos em jejum (Fig. 6.8.A) não se observou a atividade enzimática.

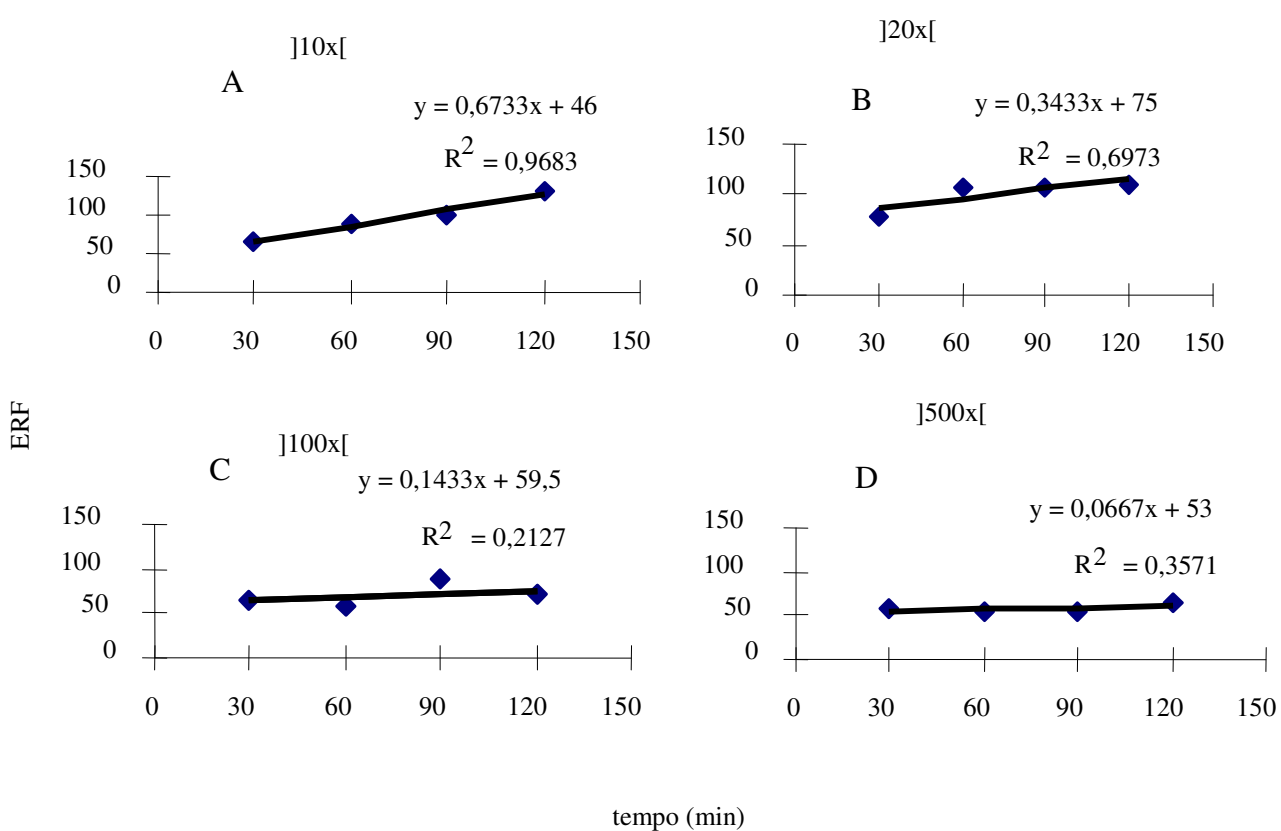


Figura 6.5. Atividade de cisteína-proteases (Catepsina L) da saliva de *Dichelops melacanthus* em diferentes diluições. A = 10x; B = 20x; C = 100 x; D = 500x. Insetos alimentados. ERF = Emissão Relativa de Fluorescência.

A saliva de *E. heros* não apresentou atividade detectável de cisteína-proteases (Catepsina L) em insetos alimentados (Fig. 6.6) e em insetos em jejum (Fig. 6.8.B).

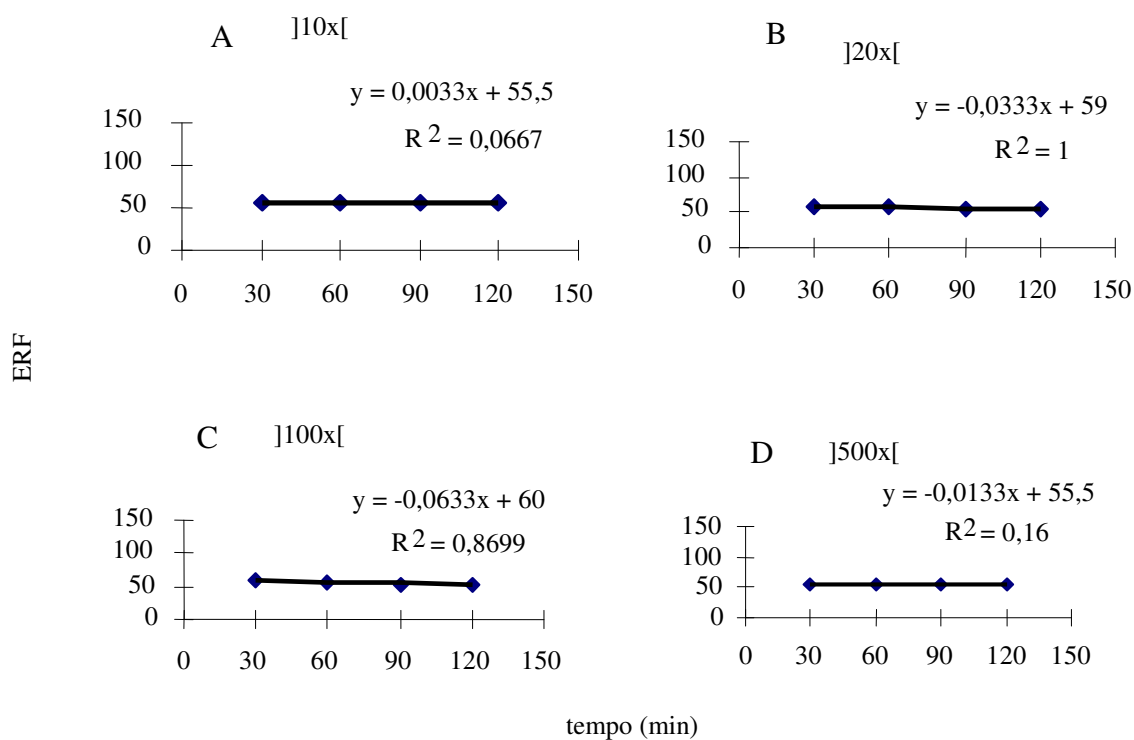


Figura 6.6. Atividade de cisteína-proteases (Catepsina L) da saliva de *Euschistus heros* em diferentes diluições. A = 10x; B = 20x; C = 100 x; D = 500x. Insetos alimentados. ERF = Emissão Relativa de Fluorescência.

Em *N. viridula* alimentados, não se observou atividade de cisteína-proteases (Fig. 6.7). Todavia a enzima foi constatada na saliva de insetos em jejum (Fig. 6.8.C).

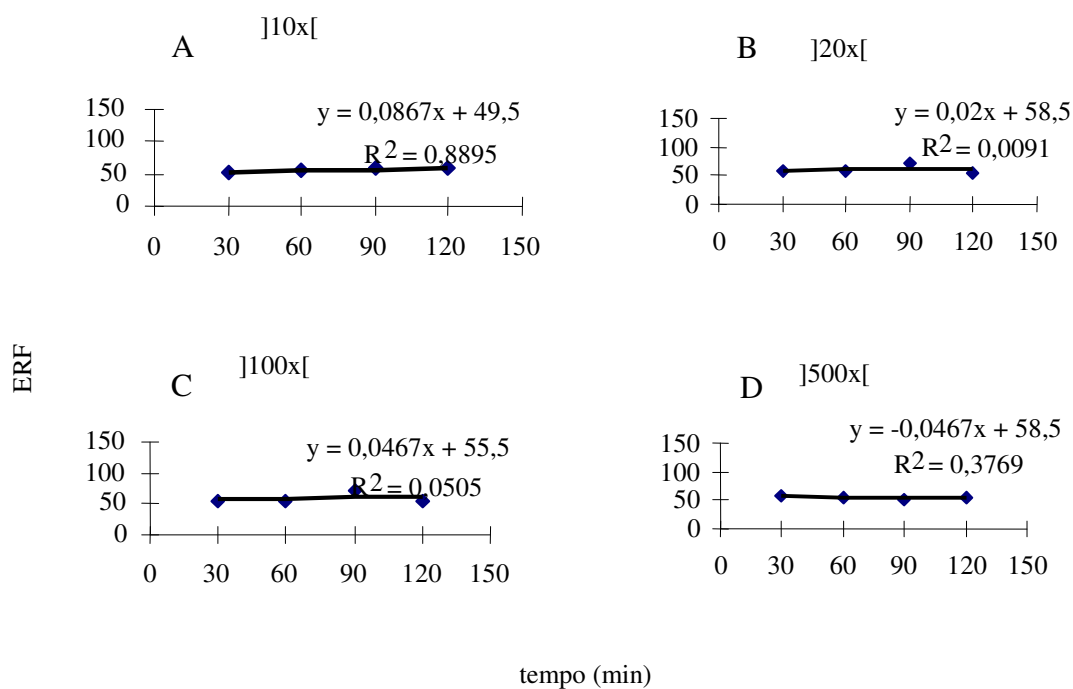


Figura 6.7. Atividade de cisteína-proteases (Catepsina L) da saliva de *Nezara viridula* em diferentes diluições. A = 10x; B = 20x; C = 100 x; D = 500x. Insetos alimentados. ERF = Emissão Relativa de Fluorescência.

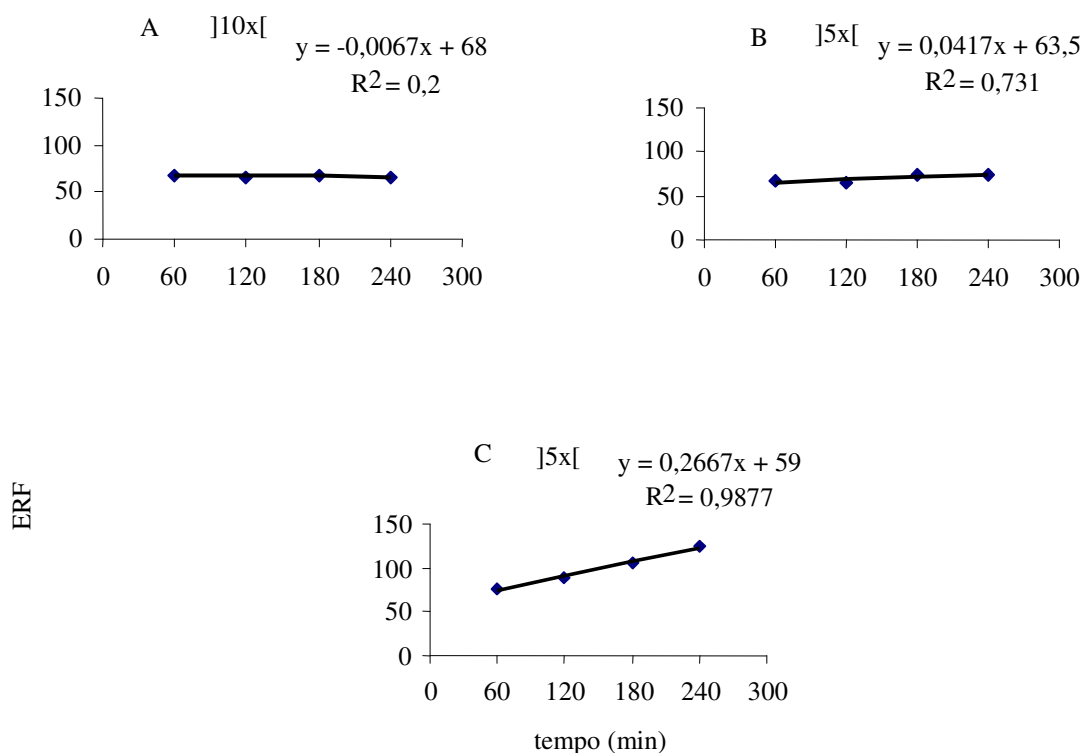


Figura 6.8. Atividade de cisteína-proteases (Catepsina L) da saliva de *Dichelops melacanthus* (A); *Euschistus heros* (B); e *Nezara viridula* (C). Insetos em jejum, diluição da saliva em colchets abertos. ERF = Emissão Relativa de Fluorescência.

Proteases foram reladas nos pentatomídeos *A. acuminata*, *A. sibirica* Reuter (Nuorteva 1954, Sossedov *et al.* 1969) e *Dolycoris baccarum* (L.) (Nuorteva & Laurema 1961). Segundo Hori (2000), as proteases estão entre as principais enzimas presentes nas glândulas salivares de heterópteros. Contudo, sua atividade poderia variar em algumas circunstâncias: em *L. rugulipennis* as proteases podem estar presentes em ninfas, mas ausentes em adultos (Nuorteva 1954), ou poderiam apresentar alterações sazonais (Hori 1970), e em *Capsus ater* L. (Miridae) essas enzimas poderiam estar presentes apenas nas glândulas salivares de insetos coletados em aveia (Nuorteva 1954). Situações semelhantes

talvez possam alterar a atividade das cisteínas-proteases salivares de *D. melacanthus*, *E. heros* e *N. viridula*.

Com exceção do relato de Gopalan (1976) desconhece-se a existência de celulasas na saliva de percevejos. Não se observou na saliva de *D. melacanthus*, *E. heros* e *N. viridula* a presença da carboximetil-celulase (Fig. 6.9.A-C).

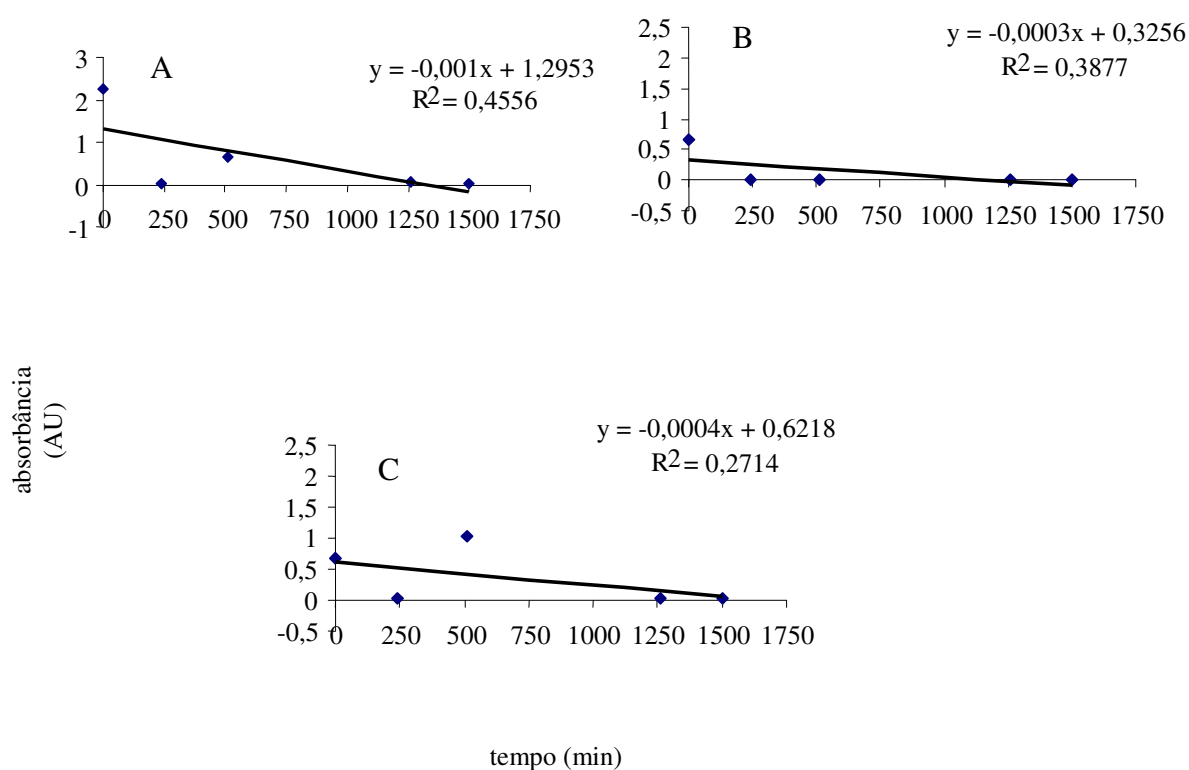


Figura 6.9. Atividade de carboximetil-celulase da saliva de *Dichelops melacanthus* (A); *Euschistus heros* (B); e *Nezara viridula* (C). Insetos em jejum. Saliva diluída 7x.

Em conclusão, a ausência de α -amilase na saliva das espécies estudadas nesse trabalho pode estar relacionada com o hábito alimentar desses percevejos. Contudo, a ausência de cisteína-proteases na saliva de *E. heros* pode ser associada com o estado fisiológico dos insetos no período da coleta da saliva. Depieri & Panizzi (não publicado)

observaram variações na temperatura que podem afetar o comportamento alimentar dos percevejos o que conseqüentemente, reduziria a área do dano que essa espécie causa às sementes de soja.

Novos estudos devem ser feitos para confirmar a presença de cisteína-proteases na saliva de espécies de pentatomídeos fitófagos. Faz-se necessário também avaliar a presença de pectinases salivares, enzimas que podem estar envolvidas no processo de necrose de tecidos e no desequilíbrio fisiológico e hormonal de plantas atacadas por percevejos (Hori 2000).

6.4. Literatura citada

Alves, L. C., Almeida, P. C., Franzoni, L., Juliano, L., & M. A. Juliano. 1996. Synthesis of no-protected aminoacyl 7-amino-4-methyl-coumarin amide by phosphorous oxychloride and preparation of specific fluorogenic substrates for papain. *Peptide Res.* 9: 92-96.

Bifano, T. D. 2008. Fisiologia molecular intestinal de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera). USP, Instituto de Química. Tese de Doutorado.

Cho, W. L., Tsao, S. M., Hays, A. R., Walter, R., Chen, J. S., Snigirevskaya, E. S. & S. Raikhel. 1999. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *J. Biol. Chem.* 274: 13311-13321.

Cohen, A. C. 1990. Feeding adaptations of some predaceous Hemiptera. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 83: 1215-1223.

- Cristofolletti, P. T., Ribeiro, A. F., Deraison, C., Rahbe, Y. & W. R. Terra. 2003.** Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. J. Insect Physiol. 49: 11-24.
- Erlanger, B. F., Kokowsky, N. & W. Cohen. 1961.** The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys. 95: 271-278.
- Feir, D. & S. D. Beck. 1961.** Salivary secretions of *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 54: 316.
- Goodchild, A. J. P. 1966.** Evolution of the alimentary canal in the Hemiptera. Biol. Rev. 41: 97-140.
- Gopalan, M. 1976.** Studies on salivary enzymes of *Ragmus importunitas* Distant (Hemiptera: Miridae). Curr. Sci. 45: 188-189.
- Grünbacher, E. & B. Kromp. 2008.** Investigations on the occurrence of wheat bugs (Scutelleridae, Pentatomidae; Heteroptera) in organic farming of Eastern Austria. pp. 98-101 In Šarapatka, B. & P. Samsonová (eds.). Bioacademy 2008 proceedings: new developments in science and research on organic agriculture. Olomouc, Bioinstitut Křížkovského.
- Hori, K. 1970.** Some variation in the activities of salivary amylase and protease of *Lygus disponsi* Linnavuori (Hemiptera: Miridae). App. Entomol. Zool. 5: 51-61.

- Hori, K. 1971.** Physiological conditions in the midgut in relation to starch digestion and the salivary amylase of the bug *Lygus disponsi*. J. Insect Physiol. 17: 1153-1167.
- Hori, K. 2000.** Possible causes of disease symptoms resulting from the feeding of phytophagous Heteroptera. pp. 11-35 *In* Schaefer, C. W. & A. R. Panizzi (eds.). Heteroptera of economic importance. Boca Raton, CRC Press.
- Kahn, M. R. & J. B. Ford. 1967.** The distribution and localization of digestive enzymes in the alimentary canal and salivary glands of the cotton stainer, *Dysdercus fasciatus*. J. Insect Physiol. 13: 1619-1627.
- Kisimoto, R. 1983.** Damage caused by rice stink bugs and their control. Japan Pestic. Inf. 43: 9-13.
- Miles, P. W. 1967.** The physiological division of labour in the salivary glands of *Oncopeltus fasciatus* (Dall.) (Heteroptera: Lygaeidae). Austral. J. Biol. Sci. 20: 787-797.
- Miles, P. W. 1972.** The saliva of Hemiptera. Adv. Insect Physiol. 9: 183-256.
- Nation, J. L. 2002.** Insect physiology and biochemistry. Boca Raton, CRC Press.
- Noelting, G. & P. Bernfeld. 1948.** Sur les enzymes amylolytiques. III. La B-Amylase: dosage d'activité et contrôle de l'absence d' a-amylase. Helvetica Chimica Acta 31: 286-290.

Nuorteva, P. 1954. Studies on the salivary enzymes of some bugs injuring wheat kernels.

Ann. Entomol. Fenn. 20: 102-124.

Nuorteva, P. 1958. On the occurrence of proteases and amylases in the salivary glands of

Cinara piceae (Panz.) (Hom.: Aphididae). Suom. Hyont. Aikak. 24: 89.

Nuorteva, P. & S. Laurema. 1961. Observations of the activity of salivary proteases and

amylases in *Dolycoris baccarum* (L.) (Het., Pentatomidae). Ann. Entomol. Fenn. 27: 93-97.

Sossedov, N. I., Gurova, N. N. & Z. B. Drozdova. 1969. Comparative proteolytic activity of

Eurygaster integriceps (Hemiptera: Pentatomidae) and *Aelia* (Pentatomidae) in infested wheat. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 5: 318-323.

Takahashi, N., Kurata, S. & S. Natori. 1993. Molecular cloning of cDNA for the 29 kDa

proteinase participating in decomposition of the larval fat body, during metamorphosis of *Sarcophaga peregrine* (fresh fly). FEBS Lett. 334: 153-157.

Taylor, G. S. & P. W. Miles. 1994. Composition and variability of the saliva of coreids in

relation to phytotoxicoses and other aspects of the salivary physiology of phytophagous Heteroptera. Entomol. Exp. Appl. 73: 265-277.

Terra, W. R. & C. Ferreira. 1994. Insect digestive enzymes: properties,

compartmentalization and function. Comp. Biochem. Physiol. 109B: 1-62.

- Terra, W. R. & P. T. Cristofolletti. 1996.** Midgut proteinases in three divergent species of Coleoptera. *Comp. Biochem. Physiol.* 113B: 725-730.
- Terra, W. R. & C. Ferreira. 2005.** Biochemistry of digestion. pp. 171-224. *In* Gilbert, L. I., Iatrov, K. & S. Gill (eds.). *Comprehensive molecular insect science*. v.4. Oxford, Elsevier.
- Varis, A. L., Laurema, S. & H. Miettinen. 1983.** Variation of enzyme activities in the salivary glands of *Lygus rugulipennis* (Hemiptera: Miridae). *Ann. Entomol. Fenn.* 49: 1-10.
- Wilson, L. A., Birmingham, V. A., Moon, D. P. & H. E. Snyder. 1978.** Isolation and characterization of starch from mature soybeans. *Cereal Chem.* 55: 661–670.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os percevejos pentatomídeos causam danos à soja por se alimentarem dos grãos. Observou-se que *P. guildinii* causou danos mais extensos nas sementes, embora possua aparelho bucal menor em comparação as outras três espécies estudadas. A duração do comportamento de alimentação de *P. guildinii* foi similar ao observado para *N. viridula*, todavia a área do dano causado pela primeira espécie foi quase duas vezes maior do que a segunda. Foi observada situação semelhante entre *D. melacanthus* e *E. heros*. Embora *D. melacanthus* apresentasse ponta de mandíbula mais longa, causou dano nas sementes três vezes menor em comparação à *E. heros*, em tempo de alimentação similar. As dimensões das mandíbulas não tem relação direta com a área do dano em sementes de soja. Com exceção de *D. melacanthus*, houve relação direta entre o tempo de alimentação e área de dano na superfície das sementes. Os danos causados aos tecidos das sementes ficaram restritos às regiões mais próximas ao local onde *D. melacanthus* introduziu os estiletes. Nas outras espécies, a saliva aparentemente perfundiu-se de forma mais ampla, causando danos mais extensos.

O desgaste das mandíbulas de *E. heros* foi significativamente maior nos insetos alimentados em dietas natural e artificial em relação aos indivíduos tenerais. Este desgaste está associado à resistência dos componentes das dietas à penetração dos estiletes.

A utilização de EDTA associado à irradiação por micro-ondas por 0,5 h mostrou-se uma metodologia adequada para a preparação de amostras de cutícula esclerotizada para estudos morfológicos, como demonstrado para o aparelho bucal de *N. viridula*. Entretanto, cada segmento do lábio necessita de um tempo de tratamento diferente para preservação da integridade das estruturas.

As áreas do lúmen do canal alimentar (Ca) e do canal salivar (Cs) no terceiro segmento do lábio foram maiores em *N. viridula* e *D. melacanthus* em comparação com *E. heros* e *P. guildinii*, que apresentou canais menos calibrosos. Contudo, quando se considera a razão Ca/Cs, essa última espécie apresentou valor relativo mais alto, possuindo área do canal de alimento relativamente maior do que as outras espécies estudadas.

A ocorrência de cisteína-proteases (Catepsina L) foi observada na saliva de *D. melacanthus* e *N. viridula*. É possível que essa enzima esteja envolvida no processo de dano dos corpos de proteína das células. Aparentemente, α -amilase e carboximetil-celulase não estão presentes na saliva dos pentatomídeos associados à soja. Contudo, essas e outras enzimas, como as poligaracturonases, que em conjunto com outras pectinases digerem a lamela média da parede celular, devem ser melhor estudadas em pentatomídeos.

Por fim, embora os resultados sugiram que enzimas digestivas presentes na saliva de *P. guildinni* sejam a causa principal dos danos em sementes de soja, essas precisam ser melhor avaliadas. Também, é necessário desenvolver um método de extração da saliva dessa espécie.

ANEXOS

Anexo 1.1. Duração dos tempos de pré-alimentação e alimentação, e área do dano superficial em sementes de soja madura por quatro espécies de pentatomídeos.

Danos x tempo de alimentação de *Dichelops melachantus*.

Semente	Horário da exposição da semente	Início	fim	duração	minutos	pixels area referencia 20x20	pixels superficie cotilédone	pixels dano	área referência (mm ²)	área do cotilédone (mm ²)	área do dano (mm ²)	dano superficial (%)
3	9:00	9:17	11:01	1:44	104	321489	69865	88	4000	86.93	0.1095	0.1
4	9:00	11:12	12:49	1:37	97	321489	76251	34	4000	94.87	0.0423	0.0
5	9:00	9:15	11:40	2:25	145	321489	73636	30	4000	91.62	0.0373	0.0
7	9:00	13:14	14:20	1:06	66	321489	76492	33	4000	95.17	0.0411	0.0
11	9:00	14:09	15:30	1:21	81	321489	75939	52	4000	94.48	0.0647	0.07
14	9:00	10:31	12:05	1:34	94	321489	69321	30	4000	86.25	0.0373	0.04
16	9:00	10:24	11:29	1:05	65	321489	70027	48	4000	87.13	0.0597	0.07
17	9:00	14:40	15:10	0:30	30	321489	66837	35	4000	83.16	0.0435	0.1
21	9:00	9:58	11:02	1:04	64	321489	78286	474	4000	97.40	0.5898	0.6
22	9:00	9:26	10:18	0:52	52	321489	63223	189	4000	78.66	0.2352	0.3
30	9:00	9:03	10:40	1:37	97	321489	63055	306	4000	78.45	0.3807	0.5
32	9:00	11:00	12:45	1:45	105	321489	60463	787	4000	75.23	0.9792	1.3
37	9:00	9:50	12:11	2:21	141	321489	67703	997	4000	84.24	1.2405	1.5
41	9:00	13:10	14:19	1:09	69	321489	65675	812	4000	81.71	1.0103	1.24
46	9:00	11:19	11:42	0:23	23	321489	63713	156	4000	79.27	0.1941	0.2
51	9:00	11:30	12:04	0:34	34	321489	71710	213	4000	89.22	0.2650	0.3
57	9:00	13:31	14:18	0:47	47	321489	76703	589	4000	95.43	0.7328	0.8
63	9:00	10:20	10:56	0:36	36	321489	62184	59	4000	77.37	0.0734	0.1
75	9:00	13:58	14:17	0:19	19	321489	69987	29	4000	87.08	0.0361	0.0
66	9:00	14:11	15:40	1:29	89	321489	66903	323	4000	83.24	0.4019	0.5
78	9:00	10:30	11:44	1:14	74	321489	74737	459	4000	92.99	0.5711	0.6
79	9:00	12:36	13:15	0:39	39	321489	64304	97	4000	80.01	0.1207	0.2
				Média	71.40909	321489	69410	265.4545	4000	86.36	0.3303	0.4
				Desvio								
				padrão	35.38181	0	5447.73	295.9963	0	6.778123	0.368282	0.444687
				EP	7.377617	0	1135.93	61.71949	0	1.413336	0.076792	0.092724

Danos x tempo de alimentação de *Euschistus heros*.

Semente	Horário da exposição da		fim	duração	minutos	pixels área referencial	pixels superfície cotilédone	pixels dano	área referência (mm ²)	área do cotilédone (mm ²)	área do dano (mm ²)	dano superficial (%)
	semente	Início										
1	09:36	11:32	12:30	00:58	58	321489	55758	657	4000	69,37	0,8174	1,2
2	09:36	15:34	16:16	00:42	42	321489	70158	390	4000	87,29	0,4852	0,6
3	09:36	13:50	14:50	01:00	60	321489	70600	809	4000	87,84	1,0066	1,1
5	09:36	10:17	12:00	01:43	103	321489	55255	1108	4000	68,75	1,3786	2,0
6	09:36	14:55	16:10	01:15	75	321489	59665	726	4000	74,24	0,9033	1,22
9	09:36	11:02	13:20	02:18	138	321489	60372	1593	4000	75,12	1,9820	2,64
12	09:36	11:38	12:20	00:42	42	321489	57860	251	4000	71,99	0,3123	0,43
13	09:36	13:10	14:54	01:44	104	321489	51705	1257	4000	64,33	1,5640	2,43
19	09:36	14:00	15:35	01:35	95	321489	56149	1345	4000	69,86	1,6735	2,4
21	09:36	09:46	09:57	00:11	11	321489	57863	163	4000	71,99	0,2028	0,3
24	09:36	14:00	15:01	01:01	61	321489	61715	805	4000	76,79	1,0016	1,3
25	09:36	10:53	12:20	01:27	87	321489	57462	870	4000	71,49	1,0825	1,5
26	09:36	11:50	12:40	00:50	50	321489	56235	395	4000	69,97	0,4915	0,7
27	09:36	12:30	13:49	01:19	79	321489	65087	1302	4000	80,98	1,6200	2,0
30	09:36	13:10	15:04	01:54	114	321489	64165	1399	4000	79,83	1,7407	2,2
38	09:36	14:03	14:25	00:22	22	321489	56676	191	4000	70,52	0,2376	0,3
41	09:36	14:45	16:18	01:33	93	321489	51106	944	4000	63,59	1,1745	1,85
49	09:36	09:52	10:16	00:24	24	321489	61857	170	4000	76,96	0,2115	0,3
56	09:36	13:10	15:00	01:50	110	321489	66231	1316	4000	82,41	1,6374	2,0
58	09:36	09:38	11:19	01:41	101	321489	70044	1217	4000	87,15	1,5142	1,7
59	09:36	09:50	10:27	00:37	37	321489	60941	472	4000	75,82	0,5873	0,8
75	09:36	09:42	10:12	00:30	30	321489	55830	347	4000	69,46	0,4317	0,6
Média					69,8182	321489	60124,27273	805,773	4000	74,8072534	1,00255	1,3438102
Desvio												
padrão					35,0491	0	5636,251804	460,4	0	7,01268386	0,57284	0,770244
EP					7,4725	0	1201,652922	98,1577	0	1,49510922	0,12213	0,1642166

Danos x tempo de alimentação de *Nezara viridula*.

Semente	Horário da exposição da semente	Início	fim	duração	minutos	pixels area referencia 20x20	pixels superficie cotilédone	pixels dano	área referência mm2	área do cotilédone (mm ²)	área do dano (mm ²)	dano superficial (%)
1	08:46	13:10	15:45	02:35	155	321489	58739	2009	4000	73,08	2,4996	3,4
2	08:46	12:25	13:48	01:23	83	321489	60088	974	4000	74,76	1,2119	1,6
4	08:46	09:05	11:04	01:59	119	321489	63285	1895	4000	78,74	2,3578	3,0
8	08:46	09:18	12:10	02:52	172	321489	65310	2243	4000	81,26	2,7908	3,4
10	08:46	11:30	12:43	01:13	73	321489	70174	950	4000	87,31	1,1820	1,35
11	08:46	11:28	12:30	01:02	62	321489	72028	931	4000	89,62	1,1584	1,29
13	08:46	09:03	10:32	01:29	89	321489	64000	1109	4000	79,63	1,3798	1,73
15	08:46	09:18	09:43	00:25	25	321489	63349	305	4000	78,82	0,3795	0,48
18	08:46	11:40	14:00	02:20	140	321489	61364	1941	4000	76,35	2,4150	3,2
20	08:46	09:26	12:00	02:34	154	321489	67164	1991	4000	83,57	2,4772	3,0
21	08:46	10:32	11:40	01:08	68	321489	56001	832	4000	69,68	1,0352	1,5
23	08:46	09:02	13:50	04:48	288	321489	57412	4888	4000	71,43	6,0817	8,5
26	08:46	08:52	11:10	02:18	138	321489	63482	2330	4000	78,98	2,8990	3,7
27	08:46	12:14	15:50	03:36	216	321489	55286	3167	4000	68,79	3,9404	5,7
29	08:46	09:50	12:07	02:17	137	321489	65637	2174	4000	81,67	2,7049	3,3
30	08:46	11:28	13:28	02:00	120	321489	66139	1836	4000	82,29	2,2844	2,8
39	08:46	10:30	11:30	01:00	60	321489	62814	743	4000	78,15	0,9244	1,2
42	08:46	11:26	13:45	02:19	139	321489	64543	2255	4000	80,31	2,8057	3,49
44	08:46	10:50	11:28	00:38	38	321489	64315	490	4000	80,02	0,6097	0,8
50	08:46	09:29	10:23	00:54	54	321489	60801	665	4000	75,65	0,8274	1,1
51	08:46	09:58	12:33	02:35	155	321489	64199	2592	4000	79,88	3,2250	4,0
52	08:46	10:56	13:14	02:18	138	321489	60121	2094	4000	74,80	2,6054	3,5
54	08:46	08:57	10:36	01:39	99	321489	57415	1399	4000	71,44	1,7407	2,4
56	08:46	12:14	13:44	01:30	90	321489	59872	1262	4000	74,49	1,5702	2,1
63	08:46	10:40	15:10	04:30	270	321489	61574	3903	4000	76,61	4,8562	6,3
64	08:46	10:50	14:30	03:40	220	321489	56120	3350	4000	69,83	4,1681	6,0
69	08:46	11:45	14:15	02:30	150	321489	59004	2575	4000	73,41	3,2038	4,4
70	08:46	09:27	11:20	01:53	113	321489	73423	2063	4000	91,35	2,5668	2,8
71	08:46	08:50	10:30	01:40	100	321489	53771	1316	4000	66,90	1,6374	2,4
73	08:46	13:05	15:00	01:55	115	321489	72296	1531	4000	89,95	1,9049	2,1
76	08:46	09:04	10:33	01:29	89	321489	68515	1088	4000	85,25	1,3537	1,6
80	08:46	09:05	15:43	06:38	398	321489	63396	5790	4000	78,88	7,2040	9,1
Média					133,34375	321489	62863,65625	1959,09375	4000	78,21562324	2,437525079	3,16592793
Desvio												
padrão					77,7761923	0	5010,13029	1229,377638	0	6,233656878	1,529604607	2,070456656
EP					13,74901825	0	885,6742757	217,3253162	0	1,101965262	0,270398447	0,366008485

Danos x tempo de alimentação de *Piezodorus guildinii*.

Semente	Horário da exposição da semente	Início	fim	duração	minutos	pixels area referencia 20x20	pixels superficie cotilédone	pixels dano	área referência mm2	área do cotilédone (mm ²)	área do dano (mm ²)	dano superficial (%)
1	08:25	12:50	13:23	00:33	33	321489	71933	540	4000	89,50	0,6719	0,8
2	08:25	08:44	11:37	02:53	173	321489	79032	4454	4000	98,33	5,5417	5,6
3	08:25	09:22	09:42	00:20	20	321489	80126	297	4000	99,69	0,3695	0,4
4	08:25	11:20	13:20	02:00	120	321489	66664	2911	4000	82,94	3,6219	4,4
5	08:25	10:35	12:50	02:15	135	321489	80319	4428	4000	99,93	5,5094	5,51
7	08:25	12:02	14:22	02:20	140	321489	61307	3773	4000	76,28	4,6944	6,15
8	08:25	10:44	11:36	00:52	52	321489	79378	1860	4000	98,76	2,3142	2,34
9	08:25	09:35	10:35	01:00	60	321489	69902	2050	4000	86,97	2,5506	2,93
10	08:25	08:29	14:22	05:53	353	321489	65893	12436	4000	81,98	15,4730	18,9
12	08:25	09:50	11:08	01:18	78	321489	65838	2022	4000	81,92	2,5158	3,1
14	08:25	12:50	13:50	01:00	60	321489	65096	2263	4000	80,99	2,8156	3,5
16	08:25	11:00	11:41	00:41	41	321489	73799	819	4000	91,82	1,0190	1,1
17	08:25	09:22	10:16	00:54	54	321489	66910	1846	4000	83,25	2,2968	2,8
18	08:25	10:12	11:52	01:40	100	321489	66790	2695	4000	83,10	3,3531	4,0
19	08:25	08:38	10:12	01:34	94	321489	65705	2257	4000	81,75	2,8082	3,4
21	08:25	08:31	11:53	03:22	202	321489	70699	8224	4000	87,96	10,2324	11,6
23	08:25	08:35	09:50	01:15	75	321489	74012	2322	4000	92,09	2,8891	3,14
25	08:25	08:45	12:00	03:15	195	321489	71435	5407	4000	88,88	6,7274	7,6
26	08:25	10:42	11:50	01:08	68	321489	70200	2655	4000	87,34	3,3034	3,8
28	08:25	12:17	12:55	00:38	38	321489	66898	620	4000	83,24	0,7714	0,9
29	08:25	08:31	09:21	00:50	50	321489	70727	1793	4000	88,00	2,2309	2,5
31	08:25	11:03	12:15	01:12	72	321489	74038	1703	4000	92,12	2,1189	2,3
32	08:25	09:35	11:00	01:25	85	321489	76587	3718	4001	95,31	4,6271	4,9
34	08:25	13:00	14:04	01:04	64	321489	67914	404	4002	84,54	0,5029	0,6
38	08:25	08:52	12:00	03:08	188	321489	84558	6308	4003	105,29	7,8544	7,5
39	08:25	13:30	14:40	01:10	70	321489	71908	4043	4004	89,56	5,0354	5,6
40	08:25	12:40	13:53	01:13	73	321489	72567	5785	4005	90,40	7,2068	8,0
44	08:25	10:05	10:40	00:35	35	321489	77338	570	4006	96,37	0,7103	0,7
45	08:25	08:55	12:30	03:35	215	321489	70171	4270	4007	87,46	5,3221	6,1
46	08:25	08:33	10:50	02:17	137	321489	67212	3358	4008	83,79	4,1864	5,0
Média				01:42	102,6667	321489	71498,53	3194,367	4001,2	88,98628	3,975799	4,501047
Desvio				01:11	71,36261	0	5634,987	2579,601	2,3853	7,018232	3,210271	3,745411
EP				00:13	13,02897	0	1028,803	470,9686	0,435494	1,281348	0,586113	0,683815

Anexo 1.2. Profundidade do dano em sementes de soja causado pela alimentação de quatro espécies de pentatomídeos após uma sessão de alimentação de 60 min.

Profundidade do dano (mm) em sementes de soja por *Dichelops melacanthus*.

semente	profundida de do dano (mm)	semente	profundida de do dano (mm)	semente	profundida de do dano (mm)	semente	profundida de do dano (mm)
1	1.5	31	0	61	0	91	0
2	0	32	0	62	0	92	0
3	0.5	33	0	63	0	93	0
4	0	34	1	64	0.2	94	0.2
5	0	35	1.6	65	0.2	95	0.2
6	2	36	1.7	66	0	96	0
7	1.2	37	1	67	1.9	97	1.9
8	1	38	0	68	0	98	0
9	1.5	39	1.5	69	0	99	0
10	0	40	0	70	0 Média		0.50505
11	0.5	41	0.5	71	0 Desvio Padrão		0.64970
12	0	42	0	72	1 EP		0.06572
13	0	43	0	73	1.6		
14	1.3	44	2	74	1.7		
15	0.2	45	1.2	75	1		
16	0	46	1	76	0		
17	0	47	1.5	77	1.5		
18	1.5	48	0	78	0		
19	0.5	49	0.5	79	0.5		
20	0.2	50	0	80	0		
21	1	51	0	81	0		
22	0	52	1.3	82	1.3		
23	0	53	0.2	83	0.2		
24	0	54	0	84	0		
25	0	55	0	85	0		
26	0.2	56	1.5	86	1.5		
27	0.2	57	0.5	87	0.5		
28	0	58	0.2	88	0.2		
29	1.9	59	1	89	1		
30	0	60	0	90	0		

Profundidade do dano (mm) em sementes de soja por *Euschistus heros*.

Semente	Profundidade do dano (mm)	Semente	Profundidade do dano (mm)	Semente	Profundidade do dano (mm)	Semente	Profundidade do dano (mm)	Semente	Profundidade do dano (mm)
1	1.2	31	0	61	1	91	0	121	0.8
2	2	32	1	62	1.5	92	2.2	122	0
3	0.5	33	0	63	1	93	0.9	123	0.3
4	1	34	1.2	64	1.5	94	1.6	124	2.5
5	0	35	0	65	0.9	95	0	125	2.6
6	0.5	36	0.5	66	2	96	1	126	0.4
7	1.6	37	0.3	67	1.4	97	0.5	127	0.8
8	1	38	1.5	68	1.2	98	0	128	1.5
9	1	39	0	69	0.8	99	0	129	1
10	0	40	1	70	0	100	0	130	1
11	1.4	41	1	71	0	101	1.4	131	0.7
12	0	42	0.5	72	1.3	102	0.7	132	0
13	0.6	43	0	73	1.9	103	2.5	133	1.2
14	1	44	0	74	0	104	1.9 média	0.841791045	
15	0	45	0	75	0.6	105	0.5 desvio padrão	0.649267778	
16	1	46	0.9	76	1.2	106	1 EP	0.060132205	
17	0.7	47	0	77	2	107	0.7		
18	0.4	48	0.8	78	1.2	108	1.3		
19	1	49	1	79	0.8	109	0.2		
20	1.7	50	0.7	80	0.6	110	1		
21	0	51	0.9	81	0.3	111	0.2		
22	0	52	1	82	1.4	112	1.3		
23	1	53	0	83	1	113	1.8		
24	1	54	1.7	84	1	114	2.2		
25	0	55	0.5	85	1	115	0		
26	0.8	56	0.9	86	2	116	0.7		
27	0	57	0.9	87	1.2	117	0.5		
28	0.7	58	0.4	88	1.8	118	1.5		
29	0.5	59	1.6	89	0.5	119	0		
30	0.4	60	1.5	90	0.2	120	1		

Profundidade do dano em semente de soja por *Nezara viridula*.

Semente	Profundidade do dano	Semente	Profundidade do dano	Semente	Profundidade do dano	Semente	Profundidade do dano
1	0.5	31	0.4	61	1.2	91	1
2	0.5	32	1.3	62	1	92	1.2
3	1.7	33	0.5	63	2.3	93	0.4
4	1.5	34	1.7	64	2.7	94	1.2
5	1	35	0.7	65	0.4	95	0.9
6	1.5	36	1.5	66	1.2	96	1.4
7	2.5	37	1.5	67	1.2	97	0.9
8	1.7	38	0.2	68	1.3	98	1.4
9	0.8	39	1	69	0.4	99	0.8
10	0.5	40	1.5	70	1.3	100	1.2
11	0.2	41	1.2	71	1	101	1.4
12	2.2	42	1	72	1.3	102	2
13	2	43	1	73	1	103	1.2
14	1.7	44	1.2	74	2.2	104	1.2
15	0.6	45	0.8	75	2.2	105	1.2
16	1.5	46	1.8	76	1.6	106	1.2
17	1.3	47	0.9	77	1.2	107	0.4
18	0.4	48	1	78	1.2	108	0.2
19	2	49	2.2	79	1.6	109	1
20	1	50	2.2	80	1.3 Média	1.237614679	
21	2.3	51	2.2	81	1.4 Desvio Padrão	0.57377712	
22	1	52	1.4	82	1.2 EP	0.054957881	
23	1.8	53	1.2	83	0.9		
24	2.5	54	2.2	84	0.4		
25	1	55	1.2	85	1		
26	0.5	56	1.3	86	0.5		
27	1	57	1.4	87	0.3		
28	1.4	58	2	88	1.2		
29	2.2	59	0.5	89	1		
30	1	60	0.8	90	1.6		

Profundidade do dano em semente de soja por *Piezodorus guildinii*.

Profundidade		Profundidade		Profundidade		Profundidade		
Semente	do dano	Semente	do dano	Semente	do dano	Semente	do dano	
1	3	31	2.5	61	2.7	91	2	
2	3.7	32	2	62	2.2	92	0.4	
3	1.4	33	2.5	63	2.5	93	2	
4	2.5	34	2	64	0.5	94	2.6	
5	3.5	35	2.5	65	2.1	95	0.4	
6	3	36	1.5	66	2	96	1.5	
7	4	37	1	67	2.6	97	2	
8	2.5	38	1	68	0.7	98	2.5	
9	2.7	39	2	69	2.3	99	2.2	
10	0.7	40	2.1	70	1.4	100	2.2	
11	2.2	41	2.3	71	2.3	101	1.5	
12	2.3	42	2.7	72	3.5	Média		2.004
13	1.5	43	2.3	73	1.9	Desvio Padrão		0.766
14	2	44	1.5	74	1	EP		0.076
15	1.5	45	3	75	2.2			
16	2.5	46	2	76	2			
17	2.3	47	2.9	77	3			
18	1.5	48	2.5	78	1.7			
19	2	49	1	79	2.5			
20	1	50	0.6	80	2			
21	3	51	2.1	81	2			
22	1.5	52	1.5	82	2.3			
23	0.7	53	1	83	1.5			
24	2	54	2.5	84	1.5			
25	2.5	55	2.5	85	0.5			
26	2	56	2	86	2.5			
27	2.5	57	1	87	1			
28	2	58	0.5	88	2.8			
29	1.9	59	3.5	89	1			
30	2	60	2	90	2.5			

Área da seção transversal dos canais de alimento e de saliva e relação Ca/Cs em pentatomídeos.

	área do canal alimentar	área do canal salivar			área do canal alimentar	área do canal salivar			área do canal alimentar	área do canal salivar			área do canal alimentar	área do canal salivar		
<i>D. melacanthus</i>	(μm^2)	(μm^2)	Ca/Cs	<i>E. heros</i>	(μm^2)	(μm^2)	Ca/Cs	<i>N. viridula</i>	(μm^2)	(μm^2)	Ca/Cs	<i>P. guildinii</i>	(μm^2)	(μm^2)	Ca/Cs	
1	147.4	78.7	1.87	1	107.4	82.6	1.30	1	200	122.15	1.64	1	78.83598	57.77274	1.364588	
2	127.0	74.7	1.70	2	113.2	82.2	1.38	2	148.65	104.13	1.43	2	85.33636	55.70673	1.531886	
3	143.0	103.8	1.38	3	121.9	81.7	1.49	3	138.17	108.62	1.27	3	109.1459	55.88309	1.953111	
4	138.0	82.9	1.67	4	115.3	91.0	1.27	4	141.67	102.02	1.39	4	107.6342	62.91257	1.710853	
5	200.2	128.4	1.56	5	127.3	73.1	1.74	5	154.57	121.89	1.27	5	103.1998	74.22525	1.39036	
6	133.4	97.4	1.37	6	109.4	86.3	1.27	6	127.66	82.77	1.54	6	104.8879	68.12799	1.539571	
7	145.2	107.9	1.35	7	125.3	99.5	1.26	7	164.88	112.02	1.47	7	106.7271	66.23835	1.611259	
8	132.1	95.9	1.38	8	128.5	93.9	1.37	8	174.91	93.98	1.86	8	124.515	54.82489	2.27114	
9	123.0	90.4	1.36	9	129.6	100.0	1.30	9	173.29	104.64	1.66	9	97.68204	50.74326	1.925025	
10	136.1	116.6	1.17	10	151.0	122.1	1.24	10	157.85	97.96	1.61	10	103.7037	74.37642	1.394309	
11	125.3	84.4	1.48	11	101.8	71.7	1.42	11	173.37	87.05	1.99	11	87.7803	61.12371	1.436109	
12	124.0	109.6	1.13	12	100.9	71.7	1.41	12	154.07	77.88	1.98	12	110.3553	75.76216	1.456601	
13	131.6	99.4	1.32	13	136.6	98.5	1.39	13	160.64	98.19	1.64	13	82.89242	59.33485	1.397028	
14	114.0	83.2	1.37	14	137.9	96.4	1.43	14	163.64	99.45	1.65	14	78.55883	68.22877	1.151403	
15	149.6	115.1	1.30	15	120.4	78.8	1.53	15	137.94	82.09	1.68	15	84.88284	58.93172	1.440359	
16	158.7	91.0	1.74	16	126.1	77.0	1.64	16	145.05	118.19	1.23	16	92.74376	53.33837	1.738781	
17	164.1	115.8	1.42	17	111.9	76.5	1.46	17	133.79	82.04	1.63	17	99.74805	58.78055	1.696957	
18	143.9	78.0	1.85	18	116.2	89.2	1.30	18	120.23	106.05	1.13	Média	97.57	62.14	1.59	
19	165.9	110.4	1.50	19	121.3	96.2	1.26	19	201.84	127.34	1.59	Desvio padrão	12.98	7.76	0.27	
20	180.0	103.0	1.75	20	113.2	83.1	1.36	20	197.51	129.60	1.52	EP	3.15	1.88	0.07	
Média	144.13	98.33	1.48	Média	120.77	87.57	1.39	21	182.82	128.19	1.43					
Desvio padrão	21.13	15.18	0.21	Desvio padrão	12.55	12.47	0.13	Média	159.65	104.11	1.55					
EP	4.725	3.394	0.048	EP	2.81	2.79	0.03	Desvio padrão	23.37	16.29	0.23					

Anexo 3.1. Desgaste da dentição mandibular de *Euschistus heros* em diferentes idades e dietas

Teneral		Comprimento total (um)	Comprimento 1 dente (um)	Altura 2º dente (um)
	1	62,86	14,29	13,14
	2	60	13,14	14,29
	3	57,14	13,71	16
	4	48,57	14,29	14,29
	5	61,14	14,86	13,14
	Média	57,94	14,06	14,17
	Desvio Padrão	5,64	0,65	1,17
	EP	2,52	0,29	0,52
30 dias dieta natural				
	1	50,29	12,57	11,43
	2	56	11,43	11,43
	3	54,29	11,43	9,71
	4	46,86	12	11,43
	5	53,71	10,86	11,43
	Média	52,23	11,66	11,09
	Desvio Padrão	3,65	0,65	0,77
	EP	1,63	0,29	0,34
60 dias dieta natural				
	1	50,29	9,14	9,71
	2	45,71	10,29	9,14
	3	42,86	10,29	8,57
	4	46,86	9,71	11,43
	5	39,43	10,29	
	Média	45,03	9,94	9,71
	Desvio Padrão	4,11	0,51	1,24
	EP	1,84	0,23	0,62
60 dias dieta artificial				
	1	49,14	14,29	11,43
	2	53,14	12,57	10,29
	3	48	13,14	10,29
	4	49,71	13,71	12
	Média	49,998	13,43	11,00
	Desvio Padrão	2,21	0,74	0,86
	EP	1,11	0,37	0,43

Anexo 3.2. Resistência da dieta natural e da dieta artificial à penetração.

soja (fresca)	Semente de		Semente de		vagem de feijão (3d)	Resistência (N)	vagem de feijão (fresca)	Resistência (N)	Resistência		dieta artificial	Resistência (N)	
	Resistência (N)	amendoim (fresco)	Resistência (N)	amendoim (3d)					soja (3d)	(N)			
1	58,2714	1	27,5839364	1	5,939955	1	5,811444	1	7,848	1	7,30845	1	4,926021429
2	56,9158364	2	28,9068	2	13,0992353	2	9,92516087	2	8,48892	2	11,0222357	2	6,52365
3	37,64097	3	31,1656154	3	7,13008636	3	5,54265	3	9,11022	3	13,52145	3	6,617976923
4	64,8173455	4	26,511525	4	13,39065	4	8,45622	4	7,39674	4	9,15273	4	6,075192857
5	59,6448	5	22,9197273	5	13,2639375	5	8,63934	5	10,226925	5	7,61612727	5	6,806630769
6	49,18734	6	22,3668	6	10,29505	6	6,91932	6	10,2943688	6	6,9651	6	5,518125
7	68,1514714	7	28,3433538	7	14,3761091	7	12,39984	7	12,80205	7	6,7689	7	8,5347
8	57,57489	8	22,6521818	8	9,394056	8	14,0109882	8	9,47646	8	7,27902	8	8,5347
9	59,8550143	9	26,814	9	13,4283808	9	14,4513563	9	11,4257647	9	7,82838	9	7,796064706
10	57,4585714	10	25,595925	10	11,5176667	10	13,19118	10	10,7755105	10	5,73885	10	6,04296
11	51,90471	11	24,4721769	11	12,3646875	11	11,0485125	11	6,77503125	11	11,3428125	11	7,093384615
12	59,98815	12	24,0485143	12	11,5685333	12	10,9929706	12	9,17235	12	6,9651	12	6,386826316
13	62,7311769	13	22,0398	13	11,118	13	10,0812176	13	7,38058235	13	7,3575	13	6,301038462
14	64,3837846	14	24,1703308	14	9,657945	14	6,72598125	14	6,82122	14	9,09654545	14	5,780353846
15	64,92258	15	22,2776182	15	11,9036605	15	9,7119	15	6,973275	15	7,46451818	15	4,34256
16	63,42165	16	22,51395	16	9,16474725	16	5,55707647	16	9,8645	16	7,8371	16	4,49298
17	47,4523714	17	24,77025	17	9,04155	17	6,13125	17	8,16538235	17	8,0115	17	4,89846
18	68,9821364	18	22,88673	18	15,09432	18	8,58663529	18	10,2821063	18	7,59294	18	4,698473684
19	49,9451625	19	21,96459	19	10,69944	19	8,98228125	19	6,9651	19	11,371425	19	5,33555
20	67,1704714	20	26,0619	20	14,1264	20	8,2404	20	11,51585	20	9,56475	20	7,18092
21	64,1841545	21	22,0011545	21	10,472175	21	8,37774	21	9,26431875	21	7,7499	21	5,61132
22	71,3008636	22	18,81885	22	8,5347	22	10,2024	22	11,7200647	22	9,77076	22	4,85922
média	59,36	média	24,49	média	11,1627857	média	9,27	média	9,22	média	8,51	23	5,912754545
desvio	8,13	desvio	2,88	desvio	2,39929793	desvio	2,65	desvio	1,79	desvio	1,89	24	7,38366
ep	1,73	ep	0,61	ep	0,51153204	ep	0,57	ep	0,38	ep	0,40	25	6,7689
												26	4,94315
												27	6,79615
												28	5,4609
												29	5,096036842
												30	5,695570588
												31	6,87313125
												32	6,2348
												33	5,557076471
												34	6,00372
												35	5,2974
											média	6,07	
											desvio	1,13	
											ep	0,19	